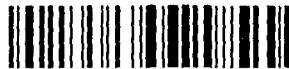


6

На правах рукописи

ПЕРМЯКОВ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ



003463816

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ
ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БАРАНИНЫ И КОЗЛЯТИНЫ
НА ОСНОВЕ ИММУНО- И ДНК-ДИАГНОСТИКИ**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

1 2 МАР 2009

Москва - 2009

Работа выполнена в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации Государственного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института 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 ветеринарных наук, профессор

Боровков Михаил Федорович
(ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина)

Ведущая организация: Российский Университет Дружбы Народов (РУДН)

Защита состоится «01» апреля 2009 г. в часов на заседании диссертационного совета Д.006.008.01 при ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «07» апреля 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук



Н.С. Павлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Повышение защиты рынка от опасной и контрафактной продукции является одним из главных направлений реформы технического регулирования.

В этой связи разработка эффективных методов и тест-систем идентификации мяса способствует исключению из торговли недоброкачественной и фальсифицированной продукции, представляющей серьезную угрозу для здоровья населения.

Идентификация баранины и козлятины в сырье и продуктах питания, а также определение фальсифицирующих примесей, таких, например, как мышцы собаки, является одним из указанных направлений.

При идентификации используются различные методические подходы, основанные на органолептических, биохимических и гистологических показателях, электрофоретическом анализе белков (Хвилья С.И. и др., 1994; Писарева В.М., 1996; Кузнецова Т.Г., 1997; Kim H. et al., 1986; Jman I.M., 1990; Rehben H., 1990; Helle A. et al., 1996; Taylor H. et al. 2000).

Экспрессны и достаточно специфичны тест-системы на основе иммунологического анализа (Серегин И.Г. и др., 1997; Mecedo-Silva ., Bardos S.F., 2000).

Методы ДНК-диагностики показали себя весьма чувствительными и специфичными способами идентификации мяса, позволяющими проводить анализ термообработанных образцов (Комаров А.А., Обухов И.Л., 2000; Комаров А.А., 2001, Комарова И.Н., 2005; Chikuni K. et al., 1990; Hunt D.J., 1997; Kappes S.M. et al., 1997; Jamamoto M. et al., 1998; Tortaglia M. et al., 1998; Buntjer J.B., Lamine A., 1999; Lockhart D.J., Winzeler E.A., 2000.).

Однако актуальными остаются задачи оптимизации методов и тест-систем применительно к конкретным видам мяса, а также к различным образцам сырья и продукции. При этом задачи технического регулирования

предусматривают как внедрение уже известных стандартизованных по международным требованиям тест-систем идентификации, так и разработку новых методов и тест-систем, отвечающих международным стандартам.

Весьма важным является изучение влияния биологических и физико-химических факторов, возникающих при хранении и термической обработке мяса, на эффективность тех или иных методов и тест-систем идентификации.

Цель и задачи исследований.

Целью исследований являлось совершенствование определения видовой принадлежности баранины и козлятины на основе иммуно- и ДНК-диагностики.

В задачи исследований входило:

- усовершенствовать идентификацию мяса мелкого рогатого скота на основе иммунодиагностики;

- усовершенствовать методы идентификации баранины и козлятины на основе амплификации и ДНК – гибридизации, а также ПЦР в режиме «реального времени»;

- провести сравнительные исследования по определению специфичности и чувствительности методов и тест-систем на основе иммуно- и ДНК-диагностики для определения видовой принадлежности мяса в сырье и мясопродуктах;

- провести сравнительный анализ влияния условий хранения и термической обработки баранины и козлятины на эффективность методов идентификации;

- разработать методические рекомендации по определению видовой принадлежности мяса и мясопродуктов.

Научная новизна

Проведено совершенствование метода идентификации баранины и козлятины с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем SOFT (США) на основе иммунодиффузии с пропитанными моноклональными антителами фильтрами. Методика

позволяет дифференцировать не термообработанную баранину от козлятины. Определена чувствительность методики, которая составляла 5% в смеси с другими видами животных, при этом время анализа сократилось в 1,5 раза.

Разработана модифицированная методика идентификации баранины и козлятины, включающая выделение ДНК с использованием протеолитических ферментов, иммуносепарацию, амплификацию ДНК с биотинилированными праймерами, гибридизацию меченных ампликонов с иммобилизованными ДНК-зондами и фотоколориметрическое детектирование гибридных молекул по интенсивности окрашивания после реакции с конъюгатом и субстратом.

Показана высокая чувствительность и специфичность метода на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией, позволяющего проводить идентификацию до 0,5% баранины или козлятины в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных.

Проведена валидация методов пробоподготовки с сорбентом «силико» и постановки ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР – РВ) с компонентами тест-систем SureFood® для идентификации баранины и козлятины. Данная методика позволяет дифференцировать мышцы баранины, козлятины и собачатины и сократить время анализа в 3 раза.

Проведен сравнительный анализ влияния способов технологической обработки баранины и козлятины на эффективность методов идентификации и показано, что наиболее эффективными для идентификации как термообработанных, так и не термообработанных продуктов являются методы ДНК – диагностики.

Практическая ценность.

На основе проведенных исследований разработаны “Методические рекомендации по идентификации козлятины и баранины на основе иммунодиффузии”, утверждённые Отделением ветеринарной медицины РАСХН 07.04.2008г.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- VI Международной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения» (Москва, 2007г.);

- заседании Ученого совета ВНИИВСГЭ (2008г.);

- межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (2008 г.).

Публикации Результаты исследований отражены в 4 научных статьях.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений.

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 10 рисунков. Список литературы включает 193 источника отечественных и зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа проводилась в период с 2006 по 2009 гг. в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации ГНУ ВНИИВСГЭ, а также в лаборатории "Союзэкспертиза" Торгово-промышленной палаты РФ.

В качестве объектов исследования использовали образцы охлажденного или замороженного мяса соответствующих видов животных.

Из образцов готовили мясные фаршевые смеси и, в зависимости от способа обработки, разделяли их на группы:

Первая группа – фарш однократно замораживали при -20°C , хранили 14 суток при -12°C , затем размораживали в воздушной среде.

Вторая группа – фарш замораживали при -20°C , ежедневно в течение 14 суток подвергали размораживанию и повторному замораживанию.

Третья группа – фарш хранили в закрытых пробирках в течение 14 суток при комнатной температуре.

Фаршевые смеси четвертой и пятой групп использовали для изготовления модели вареных колбасных и консервных изделий.

Шестая группа – образцы мясных смесей подвергали термической обработке при 55 -120°C в течение 10-120 минут, включая процедуру автоклавирования (120°C), 2атм.

Седьмая группа – контроль – образцы не подвергали обработке.

В экспериментальных исследованиях использовали тест-наборы серии SureFood на основе ПЦР и ИФА производства Германии, предоставленные фирмой "Стайлаб", для идентификации баранины и козлятины, а также тест-системы серии SureFood на основе ПЦР в режиме «реального времени» и тест-наборы систем SOFT (США) для идентификации баранины и козлятины на основе иммунодиффузии.

В исследованиях использовали образцы мясосырья, готовые и искусственно приготовленные фарши, мясные не термообработанные и термообработанные продукты.

Имунодиффузию проводили на фильтрах, пропитанных специфичными растворами антител. Результаты анализа оценивали по линии преципитации между лунками со специфичными антигенами и антителами.

Выделение ДНК животных проводили с помощью тест-набора SureFood® PREP Animal.

Выделение и очистку ДНК животных из проб продовольственного сырья и пищевых продуктов, подвергнутых термической обработке, проводили с помощью тест-набора SureFood® PREP Animal X аналогичным образом.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью комплекта для амплификации ДНК, включающего:

- смесь для ПЦР - реакционная смесь для ПЦР референс-гена;

- раствор ДНК-мишени - референс-ген, положительный контроль ПЦР на ДНК животного происхождения;

- раствор без ДНК-мишени - отрицательный контроль ПЦР (контроль контаминации);

- tag – pol (термостабильная ДНК-полимераза).

ПЦР проводили по следующей программе (рис. 1)

	Время, мин	Температура
Начальная денатурация	1 мин	95 °С
Денатурация	20 сек	95 °С
Отжиг	20 сек	48 °С
Элонгация	30 сек	72 °С
Окончательная элонгация	3 мин	72 °С
Выдержка		4 °С

Рис. 1. Режимы ПЦР.

Идентификацию ПЦР-ампликонов проводили путем гибридизации со специфическими гибридизационными зондами в лунках ИФА-планшета по следующей схеме:

- связывание биотинилированных продуктов ПЦР в лунках стрептавидин-покрытого планшета;

- денатурирование связанных продуктов ПЦР и удаление несвязанных нитей ДНК;

- гибридизация связанных продуктов ПЦР с помощью специфических меченных зондов;

- детекция гибридизационных зондов с помощью иммуносорбции антител с последующей цветной реакцией;

- измерение оптической плотности в лунках планшета после добавления стоп-раствора при 450 нм, длина волны сравнения – 620 нм.

Идентификацию мяса с помощью ПЦР в «реальном времени» проводили после выделения ДНК магнитосорбцией в мультиплексной системе с реагентами SureFood®.

Метод ПЦР в «реальном времени» (ПЦР-РВ) наиболее распространенный метод количественного определения трансгенной ДНК.

Современные методы детекции основаны на изменении флуоресценции, которое пропорционально увеличению количества ПЦР-продукта в ходе реакции. Флуоресценция измеряется в течение каждого цикла ПЦР и на основании данных измерения строится график, позволяющий следить за ходом реакции.

В своих исследованиях мы использовали два подхода для количественного определения ДНК методом ПЦР-РВ. Первый основан на неспецифическом детектировании любого двухцепочечного фрагмента ДНК, амплифицированного в ходе ПЦР-РВ. Второй использует специфическое детектирование исследуемого ПЦР фрагмента (позволяющее отличить исследуемый фрагмент от димера праймеров или продукта неспецифической амплификации).

В наиболее распространенном методе неспецифического детектирования продукта с помощью ПЦР использовался интеркалирующий (связывающийся с ДНК) флуоресцентный краситель SYBER Green I. Он начал применяться, как более специфичный и менее токсичный краситель по сравнению с бромистым этидием. При связывании с возникающим в ходе ПЦР фрагментом ДНК интенсивность флуоресценции этого красителя возрастает на несколько порядков.

Использовались также олигонуклеотидные зонды. Изменение сигнала флуоресценции в этом случае связано с реакцией зонда на возникновение специфического ДНК фрагмента в ходе ПЦР. Наиболее распространенными являются зонды, содержащие два красителя, по флуоресценции одного из которых ведется детекция, а второй используется для гашения флуоресценции первого (TaqMan зонды и их модификации, молекулярные

маяки, скорпионы). Однако есть варианты, где используются зонды с одним или с тремя красителями.

Линейные зонды, содержащие два красителя (TaqMan), представляют собой олигонуклеотиды, комплементарные одной из цепей ампликона. Флуорофор возбуждается источником света, и поглощенный квант и переносится на акцептор или гаситель. Наиболее распространенным дуплетом красителей являются карбоксифлуоресцеин (FAM) в качестве донора и карбокситетраметиламинородамин (TAMRA) в качестве акцептора. Зонд связывается с одной из цепей ампликона в ходе отжига. Фермент Taq ДНК полимеразы расщепляет связавшийся зонд в ходе удлинения специфически связавшегося праймера за счет 5'-3' экзонуклеазной активности. В результате молекулы красителей уже не связаны между собой цепочкой олигонуклеотида и флуоресценция карбоксифлуоресцеина увеличивается. Часто, вместо красителя TAMRA, который сам является флуорофором, используют нефлуоресцирующий гаситель метиловый красный, DABCYL, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3.

В наших исследованиях мы использовали, как интерколирующие красители, так и флуоресцентные меченые зонды.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по Стьюденту.

Результаты исследований.

1. Усовершенствование идентификации мяса мелкого рогатого скота на основе иммунодиффузии.

На первом этапе экспериментальных исследований мы проводили идентификацию по модифицированной методике иммунодиффузии.

Принцип реакции (метод иммунодиффузии по Оухтерлони) основан на диффузии диагностических антител и испытуемого антигена из лунок в гель, при этом в случае их взаимодействия образуется полоса преципитации между лунками со специфичными антигенами и антителами.

В наших исследованиях диски из ацетатцеллюлозы пропитывали отечественными сыворотками. Фильтры помещали на агарозный гель и инкубировали 24 часа при 37°C. Результаты исследований показали, что чувствительность метода позволяла выявлять до 5% искомого вида мяса. При этом перекрестных реакций между сырой бараниной или козлятиной и мышцами собаки не наблюдалось. Однако дифференциации между бараниной и козлятиной не было.

Методика дает возможность сократить время анализа за счет предварительной подготовки фильтров. Кроме того, использование отечественных реагентов делает анализ приблизительно в два раза экономичнее.

Разработанная методика пригодна для дифференциации баранины или козлятины от мяса собаки.

Для дифференциации баранины от козлятины необходимо использование моноклональных антител.

В своих исследованиях мы использовали тест-системы серий SOFT (США), которые выпускаются по международным требованиям систем сертификации качества серии ИСО – 9000.

В результате полученных нами данных установлено, что применение этих систем позволяет проводить дифференциацию не термообработанной баранины от козлятины с чувствительностью до 5% в фаршах из этих продуктов, и 100% при исследовании отдельного сырого мяса. Фильтры тест – системы серий SOFT (США), пропитанные моноклональными антителами, не дают перекрестных реакций.

2. Усовершенствование методов идентификации баранины и козлятины на основе ДНК-диагностики.

2.1 Усовершенствование методов идентификации баранины и козлятины на основе амплификации с последующей ДНК-

гибридизацией с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем SureFood (Германия).

Задачей данного этапа наших исследований являлась апробация методов определения видовой принадлежности мяса с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе ДНК – диагностики.

Для решения этой задачи использовали тест-системы серии SureFood (производства Германии) для идентификации мяса и мясных продуктов.

Набор SureFood[®] дает возможность ускоренно и эффективно идентифицировать видоспецифичную ДНК различных животных в составе продовольственного сырья, кормов и готовой пищевой продукции посредством полимеразой цепной реакции (ПЦР), ДНК-гибридизации и детектирования гибридных молекул на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Благодаря короткому размеру продукта ПЦР (размер ампликона составляет 125 пар оснований), определение видоспецифичной ДНК может выполняться не только в продовольственном сырье, но и в образцах, подвергнувшихся глубокой переработке.

ДНК выделяли и очищали из исследуемой пробы (использовались реагенты наборов SureFood[®] PREP Animal) для проб продовольственного сырья и не термообработанных пищевых продуктов и SureFood[®] PREP Animal X для проб продовольственного сырья и пищевых продуктов, подвергнутых термической обработке.

Проводили ПЦР амплификацию ДНК с помощью биотинилированных праймеров и полученные ампликоны гибридовали со специфическими мечеными ДНК- зондами.

Результаты гибридации определяли после реакции с субстратом и красителем по степени окрашивания визуально или по измерению оптической плотности в лунках планшета после добавления стоп-раствора по оптической плотности (таблица 1).

Таблица 1.

Идентификации баранины и козлятины с использованием стандартизованных по международным требованиям тест-систем на основе ДНК – диагностики

Источник выделения матричной ДНК	Результаты гибридизации со специфическими ДНК-зондами	
	ДНК-зонд на баранину	ДНК-зонд на козлятину
1	2	3
Сырая баранина	+	-
Сырая козлятина	-	+
Сырая свинина	-	-
Сырое мясо кур	-	-
Сырое мясо собаки	-	-
Вареная баранина	+	-
Вареная козлятина	-	+
Вареная свинина	-	-
Фарш: баранина 5%, козлятина 95%	+	+
Фарш: баранина 1%, козлятина 99%	+	+
Фарш: баранина 0,5 %, козлятина 99,5%	+	+
Фарш: баранина 0,1 %, козлятина 99,9%	-	+
Фарш: козлятина 5%, баранина 95%	+	+
Фарш: козлятина 1%, баранина 99%	+	+
Фарш: козлятина 0,5 %, баранина 99,5%	+	+
Фарш: козлятина 0,1 %, баранина 99,9%	+	-

+ - положительная реакция гибридизации

- - отрицательная реакция гибридизации

Результаты исследований показали высокую чувствительность и специфичность метода с использованием тест-системы серии SureFood, позволяющего проводить идентификацию до 0,5% баранины и козлятины в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных (таблица 1).

При этом не наблюдалось перекрестных реакций между ДНК, выделенной из баранины и козлятины, а также с ДНК, выделенной из мышечной ткани собаки.

ДНК-гибридизация со специфическими ДНК-зондами позволяла проводить дифференциацию баранины и козлятины в смешанных мясных фаршах. Эти данные хорошо согласуются с результатами идентификации свинины с использованием тест- систем данной фирмы.

2.2. Разработка модифицированной методики идентификации баранины и козлятины на основе амплификации и последующей ДНК-гибридизации.

Как было показано в предыдущем разделе, тест-набор серии SureFood позволял с высокой чувствительностью и специфичностью проводить идентификацию баранины и козлятины. Однако методика пробоподготовки включает много этапов с использованием дорогостоящих препаратов протеиназы К и хроматографических колонок для очистки ДНК.

С целью оптимизации способа идентификации баранины и козлятины нами разработана модифицированная методика на основе ДНК-гибридизации.

1 г мяса или мясной продукции гомогенизировали с 10 мл нагретого до 60 °С СТАВ-буфера. Гомогенат инкубировали при температуре 60 °С 30 мин. Остатки разрушенных тканей осаждали центрифугированием в течение 2 мин. при 500g. К супернатанту добавляли равный объем хлороформа и встряхивали в течение 10 мин. Центрифугировали 5 мин при 500g. Отбирали верхнюю водную фазу и еще раз повторяли обработку хлороформом. К

полученному объему раствора ДНК добавляли двойной объем охлажденного до 0°C этанола и осаждали ДНК центрифугированием при 5 000 g в течение 10 мин, осадок ДНК подсушивали и растворяли в дистиллированной воде.

При анализе термообработанных продуктов проводили экстракцию ДНК с помощью СТАВ-буфера, однократную депротеинизацию изопропанолом и дальнейшую очистку ДНК проводили с компонентами набора SureFood, как описано выше. Выделенные ДНК амплифицировали с неспецифическими гексануклеотидными мечеными биотином праймерами, полученные ампликоны гибридизовали со специфичными ДНК-зондами из тест-набора SureFood и детектирование гибридных молекул проводили после реакции с конъюгатом и субстратом фотокolorиметрированием.

Схема анализа представлена на рисунке 2.

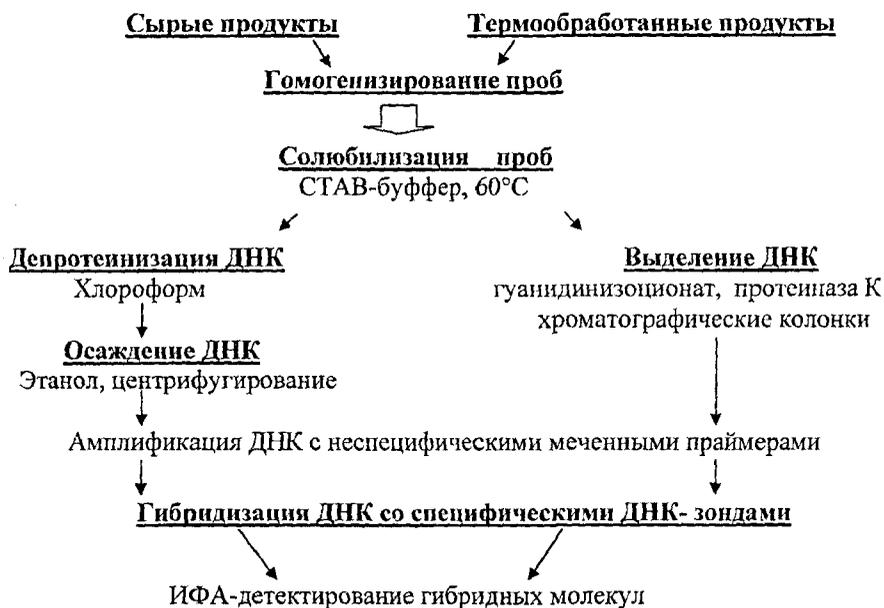


Рис. 2 Схема модифицированной методики идентификации баранины и козлятины

Как показали наши исследования, выход ДНК по модифицированной методике был на уровне с препаратами ДНК, полученными при использовании тест-набора SureFood. При этом соотношения оптических плотностей $E_{260/280}$ и $E_{260/230}$ свидетельствовали о достаточной очистке ДНК.

Приведенные данные показывают высокую специфичность идентификации баранины и козлятины по модифицированной методике и корреляцию результатов с данными, полученными с использованием тест-набора SureFood.

Разработанная модифицированная методика позволяет оптимизировать пробоподготовку при идентификации, сократив при этом в 1,5 раза количество этапов пробоподготовки и исключив использование дорогостоящих препаратов К протеиназы, а для сырых продуктов - и хроматографических колонок.

Неспецифическая амплификация с гексануклеотидными праймерами и последующая гибридизация со специфическими ДНК-зондами позволяют проводить одновременно идентификацию баранины и козлятины из одной пробы. Чувствительность метода составляла 0,1% в смеси с гетерологичными ДНК (таблица 2).

Таблица 2.

Идентификация баранины и козлятины с использованием методов ДНК-диагностики (+–положительная реакция гибридизации; - - отрицательная реакция гибридизации)

Исследуемые образцы	Модифицированная методика		тест-набор SureFood.	
	Зонд на баранину	Зонд на козлятину	Зонд на баранину	Зонд на козлятину
1	2	3	4	5
Сырая баранина	+	-	+	-
Сырая козлятина	-	+	-	+
Сырая говядина	-	-	-	-
Сырое мясо кур	-	-	-	-
Сырые мышцы собаки	-	-	-	-
Смешанный фарш (баранина, козлятина, говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3:4:5)	+	+	+	+
Смешанный фарш (козлятина, говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3:4)	-	+	-	+
Смешанный фарш (баранина, говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3:4)	+	-	+	-
Смешанный фарш (говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3)	-	-	-	-
Термообработанная козлятина	-	+	-	+
Термообработанная баранина	+	-	+	-
Термообработанная говядина	-	-	-	-
Термообработанное мясо кур	-	-	-	-
Термообработанные мышцы собаки	-	-	-	-
Термообработанный фарш (баранина, козлятина, говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3:4:5)	+	+	+	+
Термообработанный фарш (козлятина, говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3:4)	-	+	-	+
Термообработанный фарш (баранина, говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3:4)	+	-	+	-
Термообработанный фарш (говядина, мясо кур, мышцы собаки, 1:2:3)	-	-	-	-

2.3 Усовершенствование метода идентификации баранины и козлятины на основе ПЦР в режиме «реального времени».

Возможность проведения ПЦР в режиме «реального времени» была теоретически обоснована и возможность ее реализации практически продемонстрирована достаточно недавно. Технология ПЦР в режиме «реального времени» объединяет в себе амплификацию ДНК с детекцией ПЦР продукта в одной пробирке. Такой подход позволяет проводить несколько реакций в одной пробирке, снижает риск контаминации и не требует постановки электрофореза для детекции результатов. При использовании ПЦР-РВ существенно уменьшается время, затрачиваемое на анализ, а главное, возможно проведение количественной оценки результатов.

Идентификацию мяса с помощью ПЦР-РВ проводили после выделения ДНК магнитосорбцией в мультитеплексной системе с реагентами SureFood®.

Как показали исследования, тест-система SureFood® позволяет дифференцировать баранины от козлятины и от мышц собаки, при этом положительный результат анализа наблюдается как с термообработанной, так и не с термообработанной продукцией. Чувствительность метода составляла 0,01%. Применение иммуномагнитосорбции для выделения ДНК значительно ускоряет скорость анализа. Общее время реакции на порядок ниже, чем при иммунодиффузии, и в 2-3 раза меньше, чем при методе на основе амплификации с последующей гибридизацией.

3. Сравнительный анализ методов идентификации баранины и козлятины при различных условиях температурной обработки.

Оценку эффективности анализируемых методов идентификации мы проводили на образцах мясного сырья, подвергнутых таким воздействиям, как замораживание, размораживание и тепловая обработка.

3.1 Влияние условий хранения баранины и козлятины на эффективность методов видовой идентификации на основе ДНК-диагностики и иммунодиффузии.

В задачи наших исследований входила оценка влияния процессов замораживания/размораживания на эффективность методов идентификации баранины и козлятины.

Мясные смеси из первой группы однократно подвергали замораживанию при 20°C, хранили, а затем размораживали в воздушной среде. Мясные смеси из второй группы, замороженные при - 20°C, ежедневно в течение 14 суток подвергали размораживанию и повторному замораживанию. Образцы мяса из третьей группы в течение 14 дней хранили в закрытых пробирках при комнатной температуре.

Полученные данные показывают, что диагностические антисыворотки к белкам мелкого рогатого скота специфичны и позволяют установить видовую принадлежность мяса по результатам реакции иммунодиффузии в фаршевой смеси баранина/говядина. Чувствительность реакции составляла 5%. Двухкратная процедура замораживания/размораживания не влияла на чувствительность идентификации баранины. Однако дальнейшие процедуры замораживания/размораживания приводили к снижению чувствительности и позволяли проводить идентификацию только при содержании в фаршевой смеси до 45% баранины.

Практически аналогичные результаты были получены при исследовании козлятины. Однократная процедура замораживания/размораживания не сказывалась на чувствительности идентификации козлятины в фаршевой смеси козлятина/говядина. Увеличение числа операций по замораживанию/размораживанию приводило к снижению чувствительности до 40%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что многократная процедура замораживания/размораживания снижает чувствительность методов идентификации баранины и козлятины на основе иммунодиффузии.

Причиной этого, вероятно, является нарушение антигенных свойств видоспецифичных белков, происходящее в результате вымерзания влаги в тканях и образования крупных кристаллов льда, нарушающих антигенную структуру

Чувствительность методов идентификации баранины и козлятины на основе ДНК-диагностики практически мало зависела от многократного замораживания и размораживания фаршевых смесей.

Так, чувствительность идентификации баранины и козлятины с использованием тест-систем SureFood составляла 0,5%. Чувствительность ПЦР-РВ составляла 0,01%, в то время как метод иммунодиффузии позволял определять до 5% мяса в смешанных фаршах и при этом только в не термообработанных продуктах. Однако преимущество этого метода было в простоте исполнения, не требующим специального оборудования, кроме того себестоимость анализа была на 2-3 порядка меньше, чем себестоимость методов ДНК-диагностики.

Процент определения баранины и козлятины с применением модифицированной методики идентификации на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией снижался после 11-13 - кратного замораживания/размораживания всего на единицу.

Длительное хранение баранины и козлятины при комнатной температуре привело к полной утрате антигенных свойств мышечными белками и, как следствие, к невозможности определения видовой принадлежности мяса методами иммунодиффузии. Исходя из этого, можно заключить, что процессы, возникающие при порче мяса, оказывают выраженное отрицательное воздействие на эффективность методов, основанных на анализе видоспецифичных белков.

Чувствительность методов идентификации баранины и козлятины на основе ДНК-диагностики после длительного хранения менялась значительно меньше и варьировала в пределах 5-10 %.

Полученные данные свидетельствуют о том, что методы на основе ДНК-диагностики более пригодны для идентификации баранины и козлятины при нарушении режимов хранения.

3.2 Влияние термической обработки мяса на эффективность методов идентификации баранины и козлятины

На следующем этапе исследований была проведена оценка влияния различных режимов температурной обработки на эффективность методов определения видовой принадлежности баранины и козлятины. С этой целью готовили образцы мясных фаршевых смесей и подвергали их термической обработке при 55, 65, 75, 80, 100 и 120°C в течение 10 – 120 мин. Дополнительно осуществляли обработку отдельных мясных смесей при 120°C под давлением (2 атм.). В качестве контроля использовали необработанные мясные смеси.

Полученные результаты, свидетельствуют о том, что термическая обработка мясных проб оказывает существенное влияние на показатели чувствительности методов видовой идентификации баранины и козлятины на основе иммунодиффузии и ДНК-диагностики.

Непродолжительная обработка мясного сырья при сравнительно невысоких температурах (55-65°C) практически не влияла на показатели чувствительности иммунологических методов. Порог чувствительности реакции иммунодиффузии при идентификации фаршевых мясных смесей, подвергавшихся прогреванию при 55°C в течение одного часа или при 65°C в течение 30 минут, соответствовал чувствительности в контролях.

Повышение температурной экспозиции до двух часов при 55°C или одного часа при 65°C приводило к небольшому снижению антигенной активности видоспецифичных белков, которое выражалось в уменьшении порога чувствительности иммунологических реакций с 5 до 10%. Дальнейшее понижение чувствительности наблюдалось при длительном (2 часа) прогревании мясных фаршей при 65°C.

Увеличение температурной обработки до 75°C приводило к резкому снижению чувствительности иммунологических тестов. При этом удавалось выявить только 35- 40% баранины или козлятины от общей массы фаршевой смеси.

Обработка мясного сырья при 80°C приводила к утрате белками своих антигенных свойств до 80%.

Таким образом, чувствительность методов видовой идентификации баранины и козлятины на основе иммунодиффузии сильно зависела от режимов температурной обработки.

Эффективность методов ДНК-диагностики менее чувствительна к термической обработке.

В результате тепловой обработки баранины и козлятины в течение двух часов при 80°C и в течение часа при 100°C чувствительность методов ДНК-диагностики оставалась неизменной и составляла 0,1% мясной примеси анализируемого вида от общей массы мясного фарша.

Более жесткая термическая обработка приводила к снижению порога чувствительности до 0,5-1,0 %.

Автоклавирование сильно не препятствовало идентификации с помощью методов ДНК-диагностики. Чувствительность составляла 2-2,5%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что термическая обработка мясного сырья отрицательно влияет на эффективность методов видовой идентификации баранины и козлятины. Однако, благодаря большей термостабильности ДНК, методы ДНК-диагностики более устойчивы к негативному воздействию высоких температур по сравнению с иммунологическими тестами.

Полученные данные свидетельствуют о пригодности разработанных нами методов на основе ДНК-диагностики для видовой идентификации изделий из баранины и козлятины, прошедших термическую обработку.

ВЫВОДЫ.

1. Проведено совершенствование методов идентификации баранины и козлятины на основе методов иммунодиффузии, амплификации с последующей ДНК-гибридизацией и ПЦР в режиме реального времени.

Чувствительность метода иммунодиффузии была на порядок ниже, чем чувствительность методов ДНК-диагностики, и позволяла определять только не термообработанную продукцию, однако преимуществом метода являлась простота анализа, не требующего специального оборудования.

2. Разработана модифицированная методика идентификации баранины и козлятины, а также дифференциации их от мышечной ткани собаки, которая включала выделение ДНК с использованием 3% СТАВ-буфера, амплификацию ДНК с биотинилированными праймерами, гибридизацию меченых ампликонов с ДНК-зондами, иммобилизованными на планшетах, и детектирование гибридных молекул по интенсивности окрашивания после реакции с конъюгатом и субстратом.

3. Показана высокая чувствительность и специфичность методов на основе амплификации с последующей гибридизацией, позволяющих проводить идентификацию до 0,5% баранины и козлятины в сырье и продуктах питания, в том числе термообработанных.

4. Усовершенствована методика идентификации баранины, козлятины и дифференциации их от мышечной ткани собаки на основе ПЦР-РВ с использованием тест-системы SureFood® и выделением ДНК с помощью иммуномагнитосорбции. Данная методика позволяла проводить анализ в течение 1-2 часов, включая термообработанную продукцию. Чувствительность метода составляла 0,01%.

5. В результате экспериментальных исследований по влиянию различных способов термической обработки мясного сырья (размораживание/оттаивание и термическая обработка) на показатели чувствительности и специфичности методов идентификации баранины и

козлятины показаны преимущества метода на основе ДНК-диагностики и возможности их практического использования.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ.

Для использования в научных учреждениях и исследовательских лабораториях могут быть рекомендованы разработанные нами: «Методические рекомендации по идентификации козлятины и баранины на основе иммунодиффузии», утверждённые Отделением ветеринарной медицины РАСХН 07.04.2008г.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Пермяков А.Н. /Сравнительный анализ методов идентификации мясного сырья и продукции при различных условиях хранения и термообработки //Живые системы и биологическая безопасность населения. Материалы VI международной научной конференции студентов и молодых учёных, Москва-2007, С. 309.
2. Пермяков А.Н./Идентификация баранины и козлятины на основе ДНК-диагностики//Основные проблемы ветеринарной медицины и стратегии борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных животных в современных условиях. Сборник научных трудов, Махачкала-2007.
3. Пермяков А.Н./ Идентификация баранины и козлятины на основе амплификации ДНК//Вестник Российского Университета Дружбы Народов. Серия агрономии и животноводства//2008г. №4, С. 31-33.
4. Пермяков А.Н./Идентификация баранины и козлятины в реакции ПЦР//Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии сборник научных трудов, Москва-2008, том 119, С. 66-69.

ВНИИВСГЭ. г. Москва, Звенигородское шоссе, 5
Заказ 308/4. Тираж 80 экз.