УДК 577.2:575:57.08:658.562

ОБЛАП Р.В. [1,2], канд. біол. наук; **НОВАК Н.Б.** [1], канд. с.-г. наук;
ДИМАНЬ Т.М. [2], д-р с.-г. наук
ДП «Укрметртестстандарт», м. Київ[1,]
Білоцерківський національний аграрний університет[2]

РОЗРОБЛЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВІ ПЛР-РЧ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВИДОВОЇ НАЛЕЖНОСТІ ТКАНИН У СКЛАДІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Розроблено мультиплексні тест-системи на основі методу полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR) для визначення видової належності тканин тваринного та рослинного походження в складі харчових продуктів. Розроблені діагностикуми уможливлюють ідентифікацію ДНК видів *Sus scrofa, Gallus gallus, Bos taurus* і *Glycine max*. Доведено високу чутливість та специфічність визначення інгредієнтів тваринного та рослинного походження, які входять до складу багатокомпонентних харчових сумішей, у тому числі тих, що піддавались термічному обробленню. Обґрунтовано можливість використання розроблених тест-систем у практиці ветеринарно-санітарної експертизи для визначення фальсифікацій м’ясної продукції.

Ключові слова: харчова безпека, полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, тест-системи, ідентифікація видової належності, харчова продукція.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Незважаючи на підвищений інтерес до проблеми якості і безпеки харчової продукції у нашій країні, ситуація у цій сфері дедалі погіршується. Результати контролю якості продовольчої сировини і харчових продуктів свідчать про високий рівень їх забруднення токсичними хімічними сполуками, біологічними агентами і мікроорганізмами [1].

Формування ринкових відносин, стрімке зростання та розвиток потреб суспільства, збільшення обсягів виробництва продовольчих товарів, у тому числі м'ясної продукції, і водночас недосконале законодавство та слабкий контроль з боку держави за якістю харчових продуктів підштовхує недобросовісних виробників вдаватися до фальсифікацій.

Сьогодні споживчий ринок України представлено широким асортиментом готових виробів та напівфабрикатів із м’яса. У багатьох випадках під час їх виробництва має місце часткова підміна м’яса сировиною рослинного походження, вносяться малоцінні, не передбачені рецептурою добавки, а також використовується м’ясо інших, менш цінних видів тварин. У більшості випадків виробники та реалізатори фальсифікованої продукції не несуть відповідальності й залишаються безкарними, оскільки контролюючі органи не завжди спроможні визначити видову належність м'яса або його заміну на рослинні компоненти [2].

В Україні дослідження м'ясних харчових продуктів та сировини для їхнього виробництва за показниками безпеки та якості здійснюється державною ветеринарною та фітосанітарною службою відповідно до законів України «Про ветеринарну медицину», «Про безпечність та якість харчових продуктів» та інших чинних нормативно-правових актів у процесі виробництва, зберігання, транспортування та реалізації [3, 4]. Застосовують методи органолептичного, фізико-хімічного та мікробіологічного контролю, завдяки яким оцінюють передусім свіжість і безпечність як м'ясної сировини, так і готових м'ясних виробів. Гістологічний аналіз у ряді випадків дає змогу виявити застосування субпродуктів, соєвих білкових і вуглеводних добавок у м’ясному виробництві. На жаль, за допомогою зазначених методів не можна вирішити ще одне не менш важливе завдання – встановити видову належність м'ясних і рослинних інгредієнтів у складі продукту. До методів, які тією чи іншою мірою уможливлюють вирішення цього завдання, належать імунологічні методи аналізу (РА, РП, РІД, ІФА), хроматографічні методи та ДНК-технології. Кожен з цих методів має свої переваги та недоліки.

Для визначення видової належності тканин тваринного та рослинного походження в складі харчової продукції, у тому числі тій, що зазнала термічного оброблення, найбільш перспективним є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Нині розроблено численні модифікації цього методу, в яких використовують як ДНК-, так і РНК-матриці, визначають точкові мутації, оцінюють рівень експресії генів, здійснюють кількісний аналіз. Різновид ПЛР у реальному часі дає змогу прискорити проведення досліджень за рахунок відмови від стадії електрофорезу [5].

© **Облап Р.В., Новак Н.Б., Димань Т.М., 2014**

Незважаючи на високу оцінку закордонних фахівців методу ПЛР для визначення фальсифікації м’ясної продукції [6], у нашій країні цей напрям наразі не набув широкого практичного застосування в галузі ветеринарно-санітарної експертизи. Однією з можливих причин є відсутність ефективних, конкурентоспроможних та адаптованих під конкретне матеріально-технічне оснащення діагностичних лабораторій України тест-систем вітчизняного виробництва.

Метою роботи було розроблення вітчизняних діагностикумів на основі методу ПЛР з де текцією продуктів ампліфікації у режимі реального часу для ідентифікації видової належності м'яса, м'ясних і рослинних інгредієнтів у складі м'ясних продуктів, у тому числі тих, що піддались термічному обробленню.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт», яку акредитовано Національним агентством акредитації України на компетентність відповідно до вимог ДСТУ ISO / IEC 17025-21.

Матеріалом для виділення геномної ДНК слугували зразки сирого м’яса різних видів тварин і птиці, м'ясних продуктів, які піддавались термічному обробленню, кормів для тварин, продуктів переробки соєвих бобів та м'ясовмісних продуктів, до складу яких входила різноманітна рослинна сировина.

Тотальну ДНК виділяли методом СТАБ-преципітації з власними модифікаціями [7]. Концентрацію виділеної нуклеїнової кислоти та її чистоту за співвідношеннями A260/A280 та A260/A230 визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer AG 22331» (Eppendorf, Німеччина).

Як мішені для визначення належності біологічного матеріалу видам *Sus scrofa, Gallus gallus* та *Bos taurus* було використано послідовності генів цитохрому Б (Cytb) мітохондріальної ДНК свині (GenBank реєстраційний №X56295) і курки (AY235571), а також послідовність родини сателітних ДНК IV великої рогатої худоби (AF446392) [8]. Для визначення *Glycine max* використовували послідовність гена лектину (Lec) сої (K00821) [9].

Тест-системи розробляли на основі *TaqMan* технології методу ПЛР у режимі реального часу. ПЛР-ампліфікацію проводили за допомогою приладу CFX96 (BioRad). Для проведення ампліфікації підбирали оптимальні умови.

Використовували олігонуклеотидні зонди, мічені флуоресцентними барвниками FAM, HEX і ROX та гасниками флуоресценції BHQ1 і BHQ2 (Metabion, Німеччина).

Виділення ДНК з кожного досліджуваного зразка здійснювали у двох повторностях, кожен виділений зразок ДНК ампліфікували також у двох повторностях.

Результати досліджень та їх обговорення. Тест-систему для визначення видової належності м’яса було виготовлено у форматі мультиплексу, що уможливило одночасне проведення трьох незалежних реакцій в одній пробірці. Перебіг кожної з трьох реакцій відстежували за допомогою специфічного зонду, міченого заданим флуоресцентним барвником. Для виявлення мтДНК свині та курки використовували зонди, мічені барвниками HEX і FAM відповідно, для визначення послідовності ДНК великої рогатої худоби – зонд, мічений ROX.

Для виявлення компонентів рослинного походження, зокрема сої, було розроблено мультиплексну тест-систему, яка дає змогу аналізувати дві мішені – ген лектину сої та послідовність хлоропластної ДНК рослини [9]. Для ідентифікації цих послідовностей було використано зонди, мічені флуоресцентними барвниками FAM та HEX відповідно. Застосування цієї тест-системи дає можливість виявляти будь-які домішки рослинного походження як у простих, так і багатокомпонентних сумішах, а також ідентифікувати присутність сої у харчових продуктах і продовольчий сировині.

Оптимізацію умов ПЛР-ампліфікації проводили за такими параметрами, як температура відпалу праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оптимальна температура, за якої підібрані нами праймери найбільш ефективно працювали, становила 60 ºС. З-поміж чотирьох досліджених концентрацій $MgCl_2$ (1,5; 2; 2,5 і 3 мМ) найкращі результатти було отримано за концентрації 2,5 мМ. Проведення серії реакцій з різними комбінаціями концентрацій праймерів і зондів у межах від 2 до 20 пкМ уможливило досягнення мінімальної величини Ct і максимального значення ΔRn за постійної концентрації матриці-мішені. Оптимальне значення концентрації становило 20 пкМ для праймерів та 10 пкМ для зондів.

Таким чином, реакційна суміш об’ємом 20 мкл містила 100 нг ДНК, 10 мМ Tpic-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ дНТФ суміші, 20 пкМ кожного з праймерів, 10 пкМ зонду та

1 од. Taq-полімерази (Thermo Scientific, Литва). Температурний режим ПЛР складався з початкової денатурації впродовж 3 хв за 94 ºС та наступних 45 циклів: денатурації – 20 с за 95 ºС, відпалу праймерів та синтезу – 40 с за 60 ºС.

Пробу розглядали як позитивну на присутність ДНК великої рогатої худоби, свині, курки або сої у разі отримання сигналу флуоресценції за каналами ROX, HEX і FAM відповідно. Значення Ст при цьому варіювало від 15 по 40 цикл залежно від кількості матеріалу, взятого для виділення ДНК. Пробу розглядали як негативну, якщо сигнал флуоресценції був відсутній.

Оцінювання ефективності роботи розроблених тест-систем проводили за такими аналітичними характеристиками, як специфічність, чутливість, межа детектування, повторюваність та відтворюваність результатів аналізу.

Експериментальне визначення специфічності проводили тестуванням зразків таких видів: великої рогатої худоби (*Bos taurus*), свині (*Sus scrofa*), вівці (*Ovis aries aries*), коня (*Equus caballus*), кроля (*Leporidae*), курки (*Gallus gallus*), гуски (*Anser anser*), качки (*Anas platyrhynchos*), сої (*Glycine max*), рису (*Oryza sativa*), жита (*Secale cereal*), пшениці (*Triticum aestivum*), ячменю (*Hordeum vulgare*), вівса (*Avena sativa*), гречки (*Fagopyrum esculentum*), помідора (*Lycopersican esculentum*), картоплі (*Solanum tuberosum*), ріпаку (*Brassica napus*), кукурудзи (*Zea mays*). Перехресних реакцій при цьому виявлено не було.

Межу детектування тест-систем визначали шляхом приготування серії десятикратних розведень тотальної ДНК від 0,001 до 100 нг. Межа чутливості системи становила 0,1 нг.

Задля перевірки чутливості діагностикуму було виготовлено зразки, в яких домішки свинини, яловичини, курятини та сої були присутні у кількостях 0,1 та 1 %. Варто зазначити, що виготовлення фальсифікату, у якому вміст привнесених домішок становить менш ніж 1 %, є економічно невигідним. Проведені дослідження показали, що за допомогою розробленого методу аналізу можна виявляти сторонні компоненти навіть у кількостях 0,1 %.

Для апробації розроблених тест-систем було використано широкий спектр харчових продуктів, зокрема м'ясні та ковбасні вироби, консерви та напівфабрикати, паштети, пельмені, а також корми для тварин. Результати досліджень показали високу ефективність використання тест-систем для визначення видової належності трьох видів м'яса та сої у складі харчових продуктів і кормів, навіть тих, що піддавались термічному обробленню.

Висновки. Таким чином, на основі *TaqMan* технології методу ПЛР у режимі реального часу було розроблено вітчизняні діагностикуми, які уможливлюють визначення належності тканин у складі харчових продуктів видам *Sus scrofa, Gallus gallus, Bos taurus,* а також *Glycine max.* Тест-системи можуть ефективно застосовуватись для аналізу як простих, так і багатокомпонентних харчових сумішей, а також зразків, що піддавались термічному обробленню.

Розроблені тест-системи за своїми характеристиками відповідають вимогам міжнародних стандартів щодо проведення ПЛР-аналізу в харчових продуктах і продовольчій сировині і можуть бути рекомендовані для використання в практиці ветеринарно-санітарної експертизи для контролю безпеки та якості харчової продукції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Димань Т.М. Безпека продовольчої сировини і харчових продуктів: підручник / Т.М. Димань, Т.Г. Мазур. – К.: ВЦ «Академія», 2011. – 520 с.

2. Коцюмбас І.Я. Експертиза напівфабрикатів м'ясних та м'ясорослинних січених мікроструктурним методом: методичні рекомендації / І.Я. Коцюмбас, Г.І. Коцюмбас, О.М. Щебентовська. – Львів: Афіша, 2011. – 80 с.

3. Про ветеринарну медицину: Закон України / Верховна Рада України. Офіц. вид. – К.: Парлам. вид-во, 2002. – 43 с.

4. Про безпечність та якість харчових продуктів: Закон України / Верховна Рада України. Офіц. вид. – К.: Парлам. вид-во, 2005. – 28 с.

5. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві / [Облап Р.В., Новак Н.Б., Мельничук М.Д. та ін.]. – Біла Церква: БНАУ, 2010. – 68 с.

6. Пархоменко М.М. Міжнародний досвід забезпечення якості продукції / М.М. Пархоменко // Форум права. – 2010. – № 3. – С. 344–350.

7. ПЦР в реальном времени / [Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др.]; под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

8. Species identification in meat products using real-time PCR / [Jonker K.M., Tilburg J.J., Hagele G.H., de Boer E.] // Food Additives & Contaminants: Part A, 2008. – Vol. 25, № 5. – P. 527–533.

9. Тест-системи для визначення якісного та кількісного вмісту генетично модифікованих організмів (ГМО) рослинного походження в харчових продуктах. Технічні умови» / ТУ У 24.6-02568182-001:2011. – К.: ДП «Укрметртестстандарт», 2012. – 52 с.

REFERENCE

1. Dyman T.M. Bezpeka prodovolchoi sirovini I harchovih productive: pidruchnik / T.M. Dyman, T.G. Mazur. – K.: VC «Academy», 2011. – 520 s.
2. Kocyumbas I.Ya. Expertisa napivfabricativ myasnih ta myasoroslinnih sichenih microstructurnim methodom: methodichni recomendacii / I.Ya. Kocyumbas, G.I. Kocyumbas, O.M. Schebentovska. – Jviv: Afisha, 2011. – 80 s.
3. Pro veterinarnu medicinu: Zakon Ukraine / Verhovna Rada Ukraine. Ofic. vid. – K.: Parlam. vid-vo, 2002. – 43s.
4. Pro bezpechnist ta yakist’ harchovih productiv: Zakon Ukraine / Verhovna Rada Ukraine. Ofic.vid. – K.: Parlam. vid-vo, 2005. – 28 s.
5. Metodichni recomendacii schodo vikoristannya methodu polimeraznoi lancyugovoi reakcii v skotarstvi / [Oblap R.V., Novak N.B., Melnichuk M.D. ta in.]. – Bila Tserkva, 2010. – 68 s.
6. Parhomenko M.M. Mizhnarodniy dosvid zabezpechennya yakosti producii / M.M. Parhomenko // Forum prava. – 2010. – № 3. – S. 344–350.
7. PCR v real’nom vremeni / [Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. et al.]; pod red. D.V. Rebrikova. – M.: BINOM. Laboratory znaniy, 2009. – 223s.
8. Species identification in meat products using real-time PCR / [Jonker K.M., Tilburg J.J., Hagele G.H., de Boer E.] // Food Additives & Contaminants: Part A, 2008. – Vol. 25, № 5. – P. 527–533.
9. Test-systems dlya viznachennya yakisnogo ta kil’kisnogo vmistu genetichno modifikovanih organizmiv (GMO) roslinnogo pohodzhennya v harchovih produktah. Technichni umovi / TU 24.6-02568182-001:2011. – K.: DP «Ukrmetrteststandart», 2012. – 52 s.

Разработка тест-систем на основе ПЛР-РВ для определения видовой принадлежности тканей в составе пищевых продуктов

Р.В. Облап, Н.Б. Новак, Т.Н. Дымань

Разработаны мультиплексные тест-системы на основе метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ, Real-Time PCR) для определения видовой принадлежности тканей животного и растительного происхождения в пищевых продуктах. Разработанные диагностикумы позволяют идентифицировать ДНК видов *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Bos taurus* и *Glycine max*. Доказана высокая чувствительность и специфичность определения ингредиентов животного и растительного происхождения, входящих в состав многокомпонентных пищевых смесей, в том числе тех, которые подвергались термической обработке. Обоснована возможность использования тест-систем в практике ветеринарно-санитарной экспертизы при определении фальсификации мясной продукции.

Ключевые слова: пищевая безопасность, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, тест-системы, идентификация видовой принадлежности, пищевая продукция.

Надійшла 15.10.2014.