

Н.А. Москвина, Ю.В. Голубцова, О.В. Кригер

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Проанализирована методика выделения нуклеиновых кислот из плодово-ягодного сырья. Выбран наиболее эффективный и доступный метод выделения растительной ДНК из исследуемого растительного сырья. По результатам проделанной работы выявлены преимущества метода полимеразной цепной реакции.

Продовольственное сырье, выделение, идентификация, фальсификация, методика, ДНК, полимеразная цепная реакция.

Введение

Обеспечение населения качественным продовольственным сырьем имеет актуальное значение в настоящее время в нашей стране и в мире в целом. Качественное и сбалансированное питание является залогом здоровья к полноценному развитию организма. Человек в независимости от своего возраста должен получать здоровую полноценную пищу, чтобы обеспечить себя всеми необходимыми микро- и макроэлементами, витаминами и другими важными для организма питательными веществами. Качественные продукты питания оказывают влияние не только на здоровье одного человека, но и на общество в целом – это демографические, социальные, политические аспекты, которые происходят в государстве, а также обеспечение стабильности и безопасности государства в окружающем мире.

С увеличением объема частного производства и свободной торговли продовольственными товарами, в том числе плодово-ягодным сырьем, готовых продуктов и полуфабрикатов на его основе, возрастает возможность расширения их фальсификации по структуре и видовой принадлежности. На сегодня фальсификация продукции существует в любой отрасли промышленности [1]. Взросший поток товаров иностранных производителей, нетрадиционных для отечественного рынка, и значительное количество малых предприятий, изготавливающих продукцию по собственным рецептурам, так же усугубляют ситуацию.

В основном пищевые предприятия могут фальсифицировать содержание плодово-ягодной продукции различными красителями, ароматизаторами, путем добавления мякоти, введения без декларирования сахаров и кислот, купажирования дорогих и дешевых соков дешевыми, использования нестандартного сырья. Самым сложным в экспертизе является определение фальсификации переработанных плодов и ягод. Особенно трудно убедиться в качестве концентратов из экзотических фруктов [2]. Чаще всего фальсифицируют малоценное ягодное сырье, реализуя его как продукцию высокого качества, в результате чего развитие и укрепление контроля за качеством и безопасностью продуктов питания является одним из наиболее приоритетных направлений в настоящее время.

Для определения видовой принадлежности и выявления фальсификации плодово-ягодного сырья апробированы и используются органолептические и некоторые физико-химические методы определения, основанные на таких показателях, как содержание растворимых сухих веществ, состав моно- и дисахаридов, состав и содержание органических кислот, аминокислот и т.д. К сожалению, данные методы анализа не дают возможности однозначно установить видовую принадлежность плодово-ягодного сырья в полуфабрикатах и готовой продукции на его основе. Поэтому особую актуальность в настоящее время приобретает разработка современных высокоэффективных методов выявления фальсификаций продукции.

Увеличение темпов роста научно-технического прогресса в современном обществе привело к появлению новых экспресс-методов идентификации продовольственного сырья растительного происхождения и пищевой продукции на его основе. Особое место занимает метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). К основным достоинствам данного метода анализа относятся: специфичность; универсальность (могут использоваться практически любые материалы); высокую чувствительность (возможность выявлять единичные копии ДНК); малый объем биологического материала (проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы – до нескольких микролитров); высокую скорость получения результата анализа [3, 4].

Целью настоящего исследования являлся анализ влияния технологической обработки растительного сырья на эффективность видовой идентификации с помощью ПЦР-анализа.

Объект и методы исследования

В качестве объекта исследования использовались ДНК пищевых продуктов, а именно повидла, самостоятельно приготовленного на основе следующих фруктов и ягод: вишни/черешни, банана, киви.

Результаты и их обсуждение

Извлечения ДНК из продуктов питания на основе растительного сырья осуществляли с использованием различных методов экстракции: 1 – метод фенольной экстракции; 2 – метод с применением ком-

мерческого набора «ПРОБА–ЦТАБ» (комплект реагентов для выделения растительной ДНК); 3 – метод с применением коммерческого набора «Сорб-ГМО-А». В первом методе для выделения ДНК на стадии отмывания и преципитации используется химический способ – растворители, а во втором и третьем случаях – сорбент в виде эмульсии. Степень чистоты выделенных нуклеиновых кислот определяли с помощью спектрофотометрического метода анализа.

В табл. 1 представлена сравнительная характеристика методик выделения ДНК из плодово-ягодного сырья.

В ходе исследования все рассмотренные методы позволили выделить ДНК из исследуемых образцов независимо от используемого объекта. В табл. 2 представлена сравнительная характеристика чистоты выделенной ДНК продовольственного сырья.

Таблица 1

Сравнительная характеристика методик выделения ДНК из плодово-ягодного сырья

Параметры сравнения	Методы		
	с дополнительной экстракцией фенолом	«ПРОБА–ЦТАБ»	«Сорб-ГМО-А»
Масса навески, мг	100–150	100–150	100-150
Время проведения выделения, ч	2,5	1	1
Очистка ДНК	Растворители	Сорбент	Сорбент
Температура инкубации, °С	65	65	60
Продолжительность перемешивания вручную, мин	19	–	–
Продолжительность центрифугирования за весь период выделения, мин	23	16	9,5
Условия хранения пробы	+20 °С 12 часов	–20 °С 6 месяцев	–20 °С 6 месяцев

Таблица 2

Сравнительная характеристика чистоты выделенной ДНК продовольственного сырья

Название набора для выделения ДНК	Объект исследования	Чистота ДНК при A _{260/280}	Концентрация выделенной ДНК, мг/г
С дополнительной экстракцией фенолом	Повидло вишневое, 100 %	1,76	0,35
	Повидло банановое, 100 %	1,76	0,35
	Повидло из киви, 100 %	1,76	0,35
«ПРОБА–ЦТАБ»	Повидло банановое, 100 %	2,01	0,39
	Повидло из киви, 100 %	1,98	0,38
	Повидло вишневое, 100 %	1,98	0,38
	Повидло банановое, 100 %	2,01	0,39
	Повидло из киви, 100 %	1,98	0,38
«Сорб-ГМО-А»	Повидло вишневое, 100 %	1,95	0,42
	Повидло банановое, 100 %	1,94	0,43
	Повидло из киви, 100 %	1,97	0,44

Степень чистоты выделения дезоксирибонуклеиновых кислот определяли высокочувствительным спектрофотометрическим методом, основанным на поглощении монохроматического потока световой энергии при прохождении его через исследуемый раствор. Результаты экспериментальных данных, представленные в табл. 1, указывают на то, что чистота ДНК при A_{260/280} нм всех категорий фруктово-ягодных смесей при выделении ДНК первым мето-

дом с дополнительной экстракцией фенолом составляет от 1,76 до 1,77; вторым и третьим с применением наборов «ПРОБА–ЦТАБ» и «Сорб-ГМО-А» – от 1,98 до 2,01 и от 1,94 до 1,98 соответственно. При этом концентрация выделенной ДНК составляет при выделении ДНК первым методом от 0,35 до 0,36 мг/г продукта, вторым – от 0,38 до 0,40 мг/г продукта, третьим – от 0,42 до 0,45.

Несмотря на то, что оба коммерческих набора по

выделению ДНК позволяют получить растительную ДНК одинаковой чистоты, третий набор при экстракции ДНК с применением набора реагентов «Сорб-ГМО-А» количество выделенной ДНК несколько выше. Следовательно, данный подход дает возможность выбрать наиболее производительный метод выделения растительной ДНК из образцов плодово-ягодного сырья, подвергнутого технологической обработке.

Далее исследовали влияние технологической обработки плодово-ягодного сырья на эффективность видовой идентификации с помощью полимеразной цепной реакции.

Интерпретацию результатов ПЦР-анализа по определению видовой и родовой принадлежности исследуемых проб производили при помощи сконструированных положительных контролей. Продукты амплификации положительных контролей на электрофореграмме представляли собой яркую четкую полосу.

Если на электрофореграмме размер ампликонов по размеру соответствовал ПЦР-ампликону положительного контроля, то такие образцы считали «положительными», то есть содержащими ДНК соответствующего объекта плодово-ягодного сырья.

Для контроля реагентов, используемых для

ПЦР-анализа, на предмет контаминации ампликонами применяли отрицательный контроль, содержащий ионизованную воду. В электрофоретической дорожке с отрицательным контролем окрашенные полосы должны были отсутствовать. Допускалось присутствие только одной слабо окрашенной полосы, составляющей по размеру менее 50 п.н. В противном случае результаты ПЦР-анализа считали недостоверными.

В тех случаях, когда в ходе электрофоретического анализа ПЦР-продуктов из какой-либо пробы был получен неоднозначный результат (слабая окраска, диффузное размывание полос и пр.), проводили повторную амплификацию с той же пробой ДНК. Результаты проведения ПЦР принимали недостоверными, если:

– в дорожке с внутренним положительным контролем отсутствовал фрагмент ДНК указанного размера;

– в дорожке с отрицательным контролем присутствовала специфическая полоса;

– в электрофоретических дорожках присутствовали неспецифические полосы различного размера.

Результаты проведения полимеразной цепной реакции приведены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты анализа видовой идентификации при помощи ПЦР

№	1	2	3	4	5	6	7	Название образца
1					+			Повидло вишневое, 100 %
2						+		Повидло банановое, 100 %
3							+	Повидло из киви, 100 %
4		χ			+	+		Повидло банановое, 40 % вишневого сока
5					+		+	Повидло из киви, 40 % вишневого сока

Примечание. 1 – *Rubus*; 2 – *Fragaria*; 3 – *Ribes*; 4 – *Rosa*; 5 – *Prunus*; 6 – *Musa*; 7 – *Actinidia*; + – положительный результат исследования; χ – отрицательный результат исследования.

Анализ экспериментальных данных, представленных в табл. 3, указывает на высокую специфичность и эффективность метода полимеразной цепной реакции при установлении видовой идентификации продовольственного сырья.

Выводы

Проведенные исследования позволили установить наиболее производительный способ экстракции ДНК. Следовательно, достаточно широко применяется принцип ДНК-амплификации (ПЦР), который

отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и возможностью количественного анализа. Установлено, что условия обработки продовольственного сырья не влияют на эффективность ПЦР-методов видовой идентификации. Проведенные исследования представляют практический интерес при разработке новой методики идентификации видовой принадлежности растительного сырья и продуктов питания из него.

Список литературы

1. Тимофеева, В.А. Товароведение продовольственных товаров: учебник / В.А. Тимофеева. – Изд. 6-е, перераб. и доп. – М.: Изд-во «Феникс», 2006. – 363 с.
2. Комарова, И.Н. Разработка ПЦР-тест-систем для видовой идентификации и количественной оценки мясного сырья в составе мелкоизмельченных полуфабрикатов и готовых мясных продуктов: дис. ... канд. техн. наук / Комарова И.Н. – М., 2005. – 182 с.
3. Просеков, А.Ю. Современные методы исследования сырья и биотехнологической продукции / А.Ю. Просеков, О.О. Бабич, С.А. Сухих. – Кемерово, 2013. – 183 с.
4. Просеков, А.Ю. Генная инженерия: учебное пособие / А.Ю. Просеков, О.О. Бабич. – М.: Редакция журнала «Достижения науки и техники АПК», 2010. – 216 с.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел/факс: +7+ (3842) 73-40-40,
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

N.A. Moskvina, Yu.V. Golubtsova, O.V. Kriger

**APPLICATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD FOR SPECIFIC
IDENTIFICATION OF FOODS OF PLANT RAW MATERIAL PROCESSING**

The method of isolation of nucleic acids from fruit raw materials has been analyzed. The most efficient method of plant DNA isolation from the studied plant raw materials has been chosen. The results revealed the advantages of the method of polymerase chain reaction.

Food raw materials, isolation, identification, falsification, method, DNA, polymerase chain reaction.

FSBEI HVE «Kemerovo Institute of Food Science and Technology»,
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056 Russia.
Phone/fax: +7(3842) 73-40-40,
e-mail: office@kemtipp.ru

Дата поступления: 12.04.2014

