



УДК 577.213.3:637.54:637.52

DOI:10.17238/issn2072-2419.2021.3.113

## ДИЗАЙН ДУПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЯСА УБОЯ КУРИЦЫ В СМЕШАННОЙ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Гергель М.А.1, Зайцева Е.В.1, Солтынская И.В.1, Путинцева А.В.1, Крылова Е.В.1, Тимофеева И.А.1, Кирсанова Н.А.1, Акинина Т.Н.1, Василевич Ф.И.3, Богомазова А. Н.1, 2

1 – Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, 2 – Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, 3 – Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина.

**Ключевые слова:** ПЦР в реальном времени, фальсификация пищевой продукции, Gallus gallus. **Keywords:** real-time PCR, food fraud, Gallus gallus



### РЕФЕРАТ

Лабораторные ПЦР методики, которые используют при контроле качества мясных пищевых продуктов, как правило, выявляют митохондриальные последовательности ДНК (мтДНК). Множественность копий мтДНК в клетке обеспечивает высокую чувствительность таких методик. Высокая чувствительность ПЦР, выявляющих мтДНК курицы (*Gallus gallus*), может приводить к положительному результату при анализе продукции, содержащей куриные яйца. Однако ряд мясных изделий, в частности, некоторые вареные колбасы, не содержат мясо убоя курицы, при этом при их приготовлении используют куриные яйца или меланж. Методики, в основе которых лежит ПЦР, выявляющая мтДНК, не способны отличить добросовестное следование рецептуре от фальсификации мясного состава таких изделий более дешёвым куриным мясом. В данной работе мы осуществили дизайн ПЦР «в реальном времени», целевыми последовательностями которой являются ядерные последовательности. Отдельной задачей был подбор праймеров для ПЦР, служащей для внутреннего контроля, где целевыми последовательностями являются ядерные последовательности, консервативные для животных и птиц. Мы показали, что использование уникальных хромосомных последовательностей в качестве целевых последовательностей позволяет избавиться от положительных результатов в ПЦР, где в качестве матрицы используется ДНК, выделенная из куриных яиц или меланжа. Методика на основе разработанных ПЦР может быть использована для выявления фальсификации состава смешанных мясных изделий мясом убоя курицы.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время разработано множество качественных ПЦР методик для анализа состава мясной продукции [1-5]. Такие методики позволяют детектировать наличие в пище мяса, не заявленного в

составе или недопустимого по этическим и религиозным мотивам. Например, для многих европейцев неприемлемым является использование в пищу конины [6], также очевидным является использование ПЦР для сертификации халяльной пищи

[1, 3]. Во всех упомянутых выше качественных ПЦР методиках, применяемых для выявления недопустимых пищевых компонентов [1-6], целевыми последовательностями для ПЦР являются последовательности мтДНК. Это связано прежде всего с тем, что использование мтДНК для видовой генетической идентификации имеет давнюю историю, и мтДНК отсекувенирована у множества видов [7]. Кроме того, применение мтДНК в качестве целевых ПЦР последовательностей повышает чувствительность метода, так как в клетках содержатся от нескольких сотен до тысяч митохондрий [8].

Высокая чувствительность метода является несомненным преимуществом, когда необходимо убедиться, что незаявленного мяса в пищевой продукции действительно нет. Однако ПЦР, выявляющие митохондриальные последовательности курицы, могут давать продукт при использовании ДНК, выделенной из яиц или меланжа [2]. Это значит, что при помощи такой ПЦР невозможно достоверно выявить фальсификацию куриным мясом при анализе мясной продукции, в рецептуре которой заявлены яйца или меланж. К таким продуктам, например, относятся колбасы вареные фаршированные, изделия колбасные вареные мясные, колбасы ливерные, изготовленные по ГОСТам 20402, 23670, Р 54646, соответственно [9-11].

Как известно, яйца содержат лишь единичные клетки [12], при том, что количество митохондрий в каждой клетке может достигать нескольких сотен. Таким образом, яйца содержат единичные копии ядерного генома и сотни копий митохондриального генома. Соответственно, используя в ПЦР в качестве целевых последовательностей последовательности ядерного генома, можно создать методику, чувствительную к присутствию в продукции мяса убоя курицы и нечувствительную к использованию яиц.

Методики, выявляющие в мясной продукции ДНК животного или птицы, мясо которого не заявлено в рецептуре, помимо видоспецифичной ПЦР, как правило, используют дополнительную ПЦР, слу-

жащую внутренним контролем. Использование внутреннего контроля помогает подтвердить, что выделение ДНК проведено правильно, а качество выделенной ДНК позволяет получение ПЦР продукта. Использование внутреннего контроля необходимо для количественных ПЦР методик, в которых количество видоспецифичной ДНК соотносят с количеством ДНК внутреннего контроля. Целевыми последовательностями для внутреннего контроля обычно служит последовательность ДНК, консервативная внутри крупного таксона, например, класса Млекопитающие. Существует несколько опубликованных работ, где в ПЦР внутреннего контроля в качестве целевых последовательностей использовали ядерные последовательности генома. В ряде работ [13-15] использовали последовательность гена *Mstn*, кодирующего консервативный белок миостатин, с последовательностями праймеров, разработанными в 2007 году Laube et al. [16]. Возможно также использование в качестве внутреннего контроля многокопийных ядерных последовательностей таких, как последовательности ядерных генов, кодирующих рибосомную РНК (рРНК) [17].

В настоящей работе для выбора внутреннего контроля мы протестировали однокопийные и многокопийные ядерные последовательности в сравнении с митохондриальными. Мы показали, что ПЦР, использующая ядерные последовательности в качестве целевых, не даёт продукта при использовании ДНК, выделенной из яиц или меланжа. Мы показали также, что использование уникальных однокопийных последовательностей в качестве целевых последовательностей в ПЦР внутреннего контроля более надёжно для лабораторной методики в силу устойчивости к контаминации. В результате мы подобрали праймеры и зонд к уникальным однокопийным ядерным последовательностям ДНК для ПЦР, которая может использоваться в качественных и количественных методиках, нацеленных на выявление мяса убоя курицы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выбора и анализа целевых ПЦР последовательностей использовали референсные репрезентативные геномы (англ., RefSeq — representative genomes), опубликованные в базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Прежде всего, использовали геномы сельскохозяйственных животных и птицы, в панель также были добавлены геномы животных, мясо которых употребляется в пищу: геномы лошади, одногорбого верблюда. Также в панель были добавлены референсный геном человека и геномы тех животных, ДНК которых может попасть в анализируемые пробы за счет контаминации на производстве, при хранении продуктов, при отборе проб и выделении ДНК. Это геномы мыши, серой крысы и кошки.

Анализ полиморфизма в целевых последовательностях включал множественное выравнивание последовательностей при помощи алгоритма Clustal omega [18] и программы Ugene [19]. Подбор праймеров производили на онлайн-ресурсе «PCR Primer Design», расположенном на сайте компании Eurofins Genomics [20]. Специфичность праймеров оценивали при помощи онлайн-ресурса «Primer-Blast», расположенном на сайте NCBI [21]. Для выбора ультраконсервативных хромосомных последовательностей позвоночных использовали геномный браузер «Vista Enhancer Browser» [22]. Поиск гомологичных ультраконсервативных последовательностей в геномах животных и птиц проводили при помощи BLAST [23]. Последовательности выбранных нами праймеров и зондов указаны в таблице 1.

Для первичной оценки качества праймеров и зондов была создана панель образцов ДНК, выделенной из различных куриных продуктов. ДНК для этой панели выделяли из филе, бедра, кожи курицы, печени, сердца, желудка, фарша мехобвалки, а также яиц и меланжа.

Для испытания тест-систем на специфичность создали панель образцов ДНК из тканей млекопитающих, птиц, рептилий, рыбы, раков, головоногих, а именно:

курицы, утки, перепела, домашней индейки, быка домашнего, свиньи домашней, лошади, овцы, кролика, зайца-русака, лося, косули, дельфина, норки, кошки, собаки, мыши, серой крысы, золотистого хомяка, морской свинки, страуса, журавля-красавки, сизого голубя, крокодилового каймана, трески атлантической, северной креветки, кальмара. Видовая принадлежность образцов ДНК животных была верифицирована секвенированием фрагмента гена CytB по Сэнгеру [24]. Помимо образцов ДНК животных в панель добавили растительные образцы — сою и рис.

Для выделения ДНК образцы тканей измельчали отдельно, используя различные ножи и посуду. Для выделения ДНК использовали набор производства «Синтол» в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific).

ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd). Программу термоциклирования состояла 35 двустадийных циклов: 15 с при 95°C и 45 с при 62°C. Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализировали с помощью программного обеспечения амплификатора Rotor-Gene. В ПЦР использовали праймеры и флуоресцентно-меченные зонды в концентрации 250 нМ и 125 нМ, соответственно. Каждая ПЦР была поставлена минимум в двух независимых повторах и в двух технических повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В 2004 году при сравнительном анализе полных геномов человека, крысы и мыши в некодирующих областях были выявлены около 500 участков длиной более 200 п.н. с идентичной последовательностью. Большинство из этих элементов обладали также высокой идентичностью с участками генома курицы и собаки [25]. Более того, сравнение с полным геномом рыбы фугу показало высокую консервативность этих элементов в целом среди позвоночных [26]. Позднее было показано, что многие из этих ультракон-

Таблица 1  
Последовательности праймеров и зондов, использованных в работе

Название	Последовательность (5'→3')	Дли-на	Tm °C	Длина ампликона, п.н.
VE1800-F	GCTGCTTGCCATTTTCATATC	22	62	89
VE1800-Z	TTATGACAGGGCTGCAGCCAAGAT	24	68	
VE1800-R	AACTTGCACACTAATTCCCTTTG	23	62	
16S-F	GGTTCGTTTGTTC AACGATTA	21	59	74 у млекопитающих 75 у птиц
16S-Z	TCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAG	28	69	
16S-R	AGATAGAAACCGACCTGGATT	21	61	
Rarres-F	GTGAATGAGATCCACGGAAAGA	22	62	106
Rarres-Z	CAGCAAAGGGTGAAGGAGGGATCA	24	68	
Rarres-R	CTGCCCTAACTCTGCTGAAA	20	62	

сервативных элементов являются тканеспецифичными энхансерами, функционирующими в раннем эмбриональном развитии [27].

Для подбора праймеров и зонда (табл. 1) был выбран ультраконсервативный элемент, который в этом геномном браузере обозначен как VE-1800. В геноме человека элемент VE-1800 находится в интроне гена ZFPM2 с координатами chr8:106602866-106607408 в сборке генома человека hg19. Поиск гомологичных последовательностей в геномах животных и птиц проводили при помощи BLAST [23].

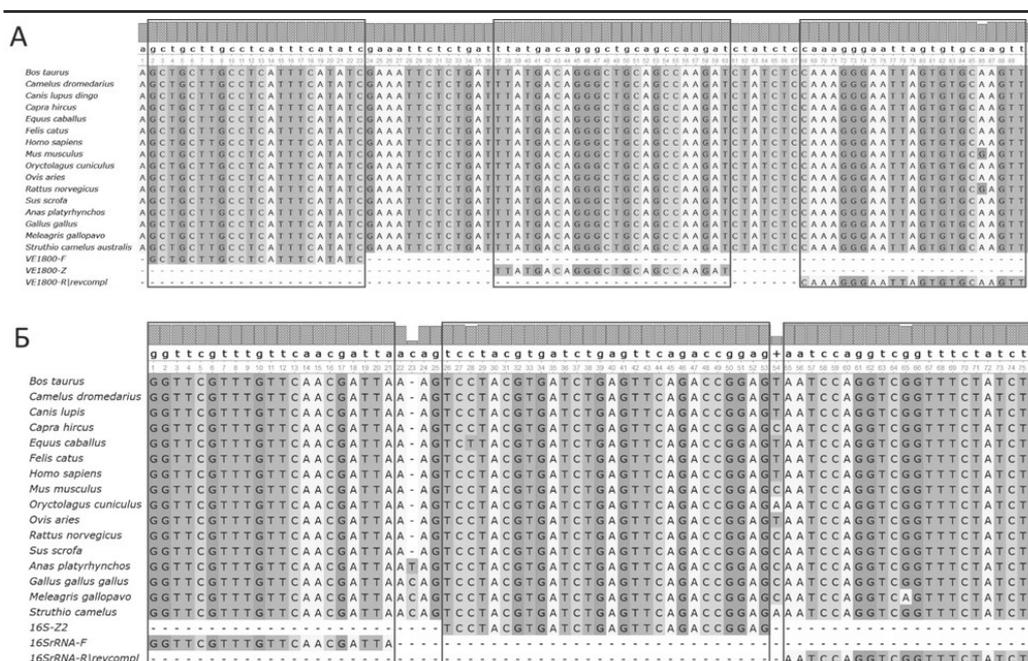
Множественное выравнивание участка последовательности ультраконсервативного элемента VE-1800 млекопитающих и птиц показало, что на данном участке наблюдается 100% идентичность практически всех последовательностей (Рис. 1). Исключением являются домовая мышь и серая крыса, представляющие отряд Грызуны, в последовательностях которых есть однобуквенное несовпадение в области отжига обратного праймера ближе к 5'-концу. Такое несовпадение должно лишь незначительно снизить эффективность ПЦР.

Геномный элемент VE1800 относится к ультраконсервативным энхансерам позвоночных, поэтому мы проверили также, как будут работать ПЦР с выбранными

праймерами и зондом, если в качестве матрицы использовать ДНК рыб: стерляди, речного угря, сазана и судака. Хотя праймеры и зонд неидеально отжигаются на последовательностях VE-1800 рыб, однако количество несовпадений не настолько велико, чтобы полностью исключить получение детектируемого продукта в ПЦР, при этом эффективность реакции должна быть невысокой, а кривая накопления сигнала должна значительно отличаться по наклону от кривых ПЦР, в которых использована ДНК, выделенная из мясных продуктов.

В качестве многокопийного хромосомного гена был выбран ген, кодирующий предшественник рРНК 45S. В человеческом геноме порядка 400 копий этого гена, локализованных в коротких плечах 5 акроцентрических хромосом: 13, 14, 15, 21 и 22 [28]. Для выбора консервативного участка проведено множественное выравнивание последовательностей гена 45S рРНК человека, коровы, свиньи, овцы, козы, верблюда, лошади, кролика, кошки, собаки, утки, курицы и индейки. Затем вручную выбраны подходящие олигонуклеотидные последовательности праймеров и зонда, оценка которых была проведена при помощи онлайн-программ «PCR Primer Design» и «Primer-Blast».

Для сравнения ПЦР, в которых целе-



**Рис. 1.** Множественное выравнивание последовательностей млекопитающих и птиц вместе с последовательностями праймеров и зонда. Участки отжига праймеров и зонда выделены красными прямоугольниками. Обратный праймер приведен в виде перевёрнутой комплементарной последовательности.  
**А.** Геномный элемент VE-1800. **Б.** Ген 16S рРНК.

выми последовательностями является ядерный геном или мтДНК, мы выбрали также внутренний контроль на основе мтДНК. Для этого был выбран ген, локализованный в мтДНК и кодирующий митохондриальную 16S рРНК. Порядок подбора праймеров и зонда был аналогичен описанному для 45S рРНК (табл. 1). Ген 16S рРНК является недостаточно консервативным, поэтому есть однонуклеотидный полиморфизм в районе отжига зонда и обратного праймера, а именно: есть отличия от консенсусной последовательности у лошади и у индейки, соответственно (Рис. 1Б). В качестве специфичного для курицы участка геномной ДНК выбран ген *Rarges1*. Этот ген кодирует белок овокаликсин-32, необходимый для формирования яичной скорлупы. Праймеры и зонд отжигаются в первом интроне гена *Rarges1* (табл. 1).

Последовательность целевого участка гена *Rarges1* высокополиморфна даже среди птиц, причём у индейки и страуса – такой участок отсутствует (Рис. 2). Точками указаны совпадающие нуклеотиды, двойными и ординарными чёрточками указаны делеции разного генеза, оранжевые вертикальные чёрточки означают позиции инсерций. Красными прямоугольниками выделены позиции праймеров и зонда, использующихся в ПЦР. Праймеры и зонд для ПЦР внутреннего контроля были испытаны на панели образцов ДНК, выделенной из различных куриных продуктов: из филе, бедра, кожи, желудка, печени, фарша мехобвалки, а также яиц и меланжа. Основным критерием для выбора рабочих олигонуклеотидов было полное отсутствие флуоресцентного сигнала в ПЦР, в которой была использована ДНК, выделенная из яиц и

Немой перепел	GTGATGATGATCCACGGAAAGTCTGCCAGGGAATGCCAGAGGAGACGGGGACTTCAGCAAGGGGTGAGGGGGATCA	CCCTTTCAGCAGAGTTAGGCCAG
Индеек		
Беркут	TAA,====G...TG...G...==...TG...CA...A...CA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...C.G.A...	
Бадобан	TCA,====G.A.CA...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...TC...==...GA...A...C...==...CA.C...A...CC	
Крикливый зяблик	TCA,ACT.G...CA...G.G...A...ATG...GC.AG...GT...AGT...AA...CC...==...G...C...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Малая белая цапля	TCA,====G...A...==...TG...CA...A...GA...AGT...A...==...G...C...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Кряква	-----CT...C...CAT...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Глушь	TCA,ACT.G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Кукол	TCA,====G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Орлан-белохвост	TCA,====G...TG...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Красный фламинго	TCA,ACC.G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Венценосный журавль	TCA,====G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Ходулин	TCA,ACT.G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Обыкновенная сипуха	TCA,ACT.G...CT...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Обыкновенная кукушка	CA,ACT.G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Сизый голубь	-----CAGC...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Дрофа-красотки	TCA,====G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Солнечная цапля	TCA,====G...CA...G...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Африканский страус		
Волнистый попугайчик	TCA,====G...CAT...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Полосатый трогон		
Американский ворон	====CA...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Какаду	TCA,====G...CAT...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Серая ворона	-----CA...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Домашняя канарейка	-----CA...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Стребок	-----CA...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Белогорный перовей	-----CA...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	
Зеленая амандина	-----CA...GG...==...TG...CA...A...GA...AGT...AA...C...==...G...GA...C...==...T.TG...A...A...	

Рис. 2. Полиморфность участка гена *Rarres1* среди птиц. Сверху – последовательность курицы; ниже – гомологичные последовательности ДНК различных птиц.

меланжа, т. е. из пищевой продукции, не относящейся к мясным продуктам. По этому критерию ожидаемо не прошли проверку праймеры и зонда для ПЦР, выявляющей участок мтДНК (16S рРНК), так как при использовании в ПЦР ДНК, выделенной из яиц или меланжа, флуоресцентный сигнал начинал увеличиваться, начиная с 30–32 цикла. Во всех остальных ПЦР, где целевыми последовательностями служили хромосомные участки генома, при использовании ДНК, выделенной из яиц и меланжа, амплификации не происходило.

ПЦР, где целевой последовательностью служил многокопийный хромосомный ген 45S рРНК, является высокочувствительной. Первые признаки роста флуоресцентного сигнала в этой ПЦР регистрировали примерно на 6 циклов раньше, чем в случае однокопийного хромосомного элемента – на 10–12 цикле. К сожалению, иногда на поздних циклах мы регистрировали небольшой сигнал в реакциях, служащей контролем выделения. Регистрация подобного сигнала может быть вызвана контаминацией реагентов для выделения ДНК следовыми количествами ДНК человека [29]. По этой причине мы отказались от использования в методике гена 45S рРНК в качестве целевой последовательности в ПЦР внутреннего контроля.

ПЦР для выявления VE1800 не давала продукта в случае использования

ДНК, выделенной из яиц и меланжа, при этом во всех образцах, содержащих мясо убоя курицы, флуоресцентный сигнал начинал расти на 16–22 цикле. Таким образом, по этому критерию мы в качестве ПЦР внутреннего контроля выбрали ПЦР, выявляющий уникальный геномный элемент VE1800.

В дальнейших тестах мы использовали дуплексную ПЦР, где в одной пробирке в двух независимых ПЦР с использованием специфичных праймеров и зондов, меченых разными флуоресцентными красителями, определяли присутствие ДНК курицы (ген *Rarres1*) и ДНК внутреннего контроля (геномный элемент VE1800). Регистрацию флуоресцентного сигнала в ПЦР, выявляющей ген *Rarres1*, проводили в канале Yellow, регистрацию сигнала в ПЦР внутреннего контроля вели в канале Red. Для подтверждения специфичности методики приготовили контрольную панель, содержащую ДНК, выделенную из образцов тканей позвоночных различных классов (птицы, млекопитающие, рыбы), а также беспозвоночных (головастики, ракообразные) и растений.

В рамках проанализированной панели образцов дуплексная ПЦР показала 100% специфичность, а именно: по каналу Yellow, в котором регистрировали видоспецифичный ген *Rarres1*, наблюдали амплификацию только в ПЦР, где использовали ДНК курицы (*Gallus gallus*), выде-

ленную из мяса курицы, но не из яичных продуктов. По каналу Red, в котором проводили регистрацию консервативного участка генома позвоночных VE1800, наблюдали амплификацию во всех ПЦР, в которых использовали ДНК млекопитающих, птиц и рептилий. Таким образом, ПЦР внутреннего контроля обладает необходимой универсальностью для создания не только качественной, но и количественной методики для анализа состава смешанной мясной продукции.

#### **ВЫВОДЫ**

В данной работе мы разработали праймеры и зонды для дуплексной ПЦР в «реальном времени», с помощью которой можно выявить наличие в анализируемой пробе ДНК курицы и ДНК внутреннего контроля. Внутренним контролем служит участок генома, последовательность которого консервативна у птиц и млекопитающих. Оба детектируемых участка ДНК локализованы в ядерном геноме, что исключает детекцию в анализируемых пробах ДНК яиц и меланжа. Данная дуплексная ПЦР может служить основой для разработки качественных и количественных методик, предназначенных на выявление фальсификаций мясных пищевых продуктов мясом убойной курицы. Разработанная нами ПЦР внутреннего контроля может оказаться полезной не только для методик контроля качества пищевых продуктов, но и для разработки диагностических тестов.

**Design of duplex real-time PCR for the detection of chicken meat in mixed meat products.** Gergel M. A.1, Zaitseva E. V., Soltynskaya I. V.1, Putintseva V.1, Krylova E. V.1, Timofeeva I. A., Kirsanova N. A., Akinina T. N.1, Vasilevich F. I.1, Bogomazova A. N.1,2. 1. All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed, 2-Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, 3 - Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K. I. Scriabin.

#### **ABSTRACT**

Laboratory PCR techniques used to control the quality of meat products typically

detect mitochondrial DNA sequences (mtDNA). The multiplicity of mtDNA copies in the cell provides such PCR techniques a high sensitivity. The high sensitivity of PCR detecting chicken mtDNA can lead to a positive result when applied to analyze mixed meat products containing chicken eggs. Many meat products, particularly some cooked sausages, do not contain chicken meat, while their recipes include chicken eggs or melange. In such cases, PCR detecting mtDNA cannot distinguish correctly the recipe ingredients from the food fraud with cheaper chicken meat. In this work, we carried out a design of real-time PCR which uses nuclear sequences as a target. A separate task was to select primers for PCR for internal control, for which we selected a nuclear sequence conserved for animals and birds as a target. Here we show that using a unique nuclear sequence as a target sequence allows getting rid of positive results in PCR, when the template is DNA, isolated from chicken eggs or melange. The designed real-time PCR can be used in protocols applied to detect the falsification of the mixed meat products by chicken meat.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Фомина Т. А., Минаев М. Ю. Система идентификации для контроля халяльной мясной продукции // Мясная индустрия. – 2011. – №. 3. – С. 32-34.
2. Красюков Ю. Н. и др. Качественная видовая идентификация яиц в яичных продуктах методом полимеразной цепной реакции // Новое в технике и технологии переработки птицы и яиц. – 2011. – С. 51-83.
3. López-Andreo M. et al. Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA // Food Chemistry. – 2012. – Т. 134. – №. 1. – С. 518-523.
4. Soares S. et al. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products // Meat Science. – 2013. – Т. 94. – №. 1. – С. 115-120.
5. Floren C. et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) // Food chemistry. – 2015. – Т. 173. – С. 1054-1058.

- 6.Yamoah F., Yawon D. Assessing super-market food shopper reaction to horsemeat scandal in the UK //International Review of Management and Marketing. – 2014.
- 7.Kocher T. D. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1989. – Т. 86. – №. 16. – С. 6196-6200.
- 8.D'Erchia A. M. et al. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity // Mitochondrion. – 2015. – Т. 20. – С. 13-21.
- 9.ГОСТ 20402-2014 Колбасы вареные фаршированные. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2019. — 18 с
- 10.ГОСТ 23670-2019 Изделия колбасные вареные мясные. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2019. — 32 с
- 11.ГОСТ Р 54646-2011 Колбасы ливерные. Технические условия. — М.: Стандартинформ, 2012. — 18 с.
- 12.Klein S., Grossmann R. Cell number and sex ratio in unfertilized chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*) //Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology. – 2008. – Т. 309. – №. 1. – С. 47-54.
- 13.Iwobi A. et al. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat //Food chemistry. – 2015. – Т. 169. – С. 305-313.
- 14.Iwobi A. et al. A multiplex real-time PCR method for the quantitative determination of equine (horse) fractions in meat products // Food Control. – 2017. – Т. 74. – С. 89-97
- 15.Druml B. et al. A novel reference real-time PCR assay for the relative quantification of (game) meat species in raw and heat-processed food //Food Control. – 2016. – Т. 70. – С. 392-400
- 16.Laube I. et al. Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods //International journal of food science & technology. – 2007. – Т. 42. – №. 1. – С. 9-17.
- 17.Amaral J. S. et al. Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products //Food Control. – 2017. – Т. 72. – С. 53-61
- 18.Sievers F., Higgins D. G. Clustal omega //Current protocols in bioinformatics. – 2014. – Т. 48. – №. 1. – С. 3.13. 1-3.13. 16.
- 19.Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. – 2012. – Т. 28. – №. 8. – С. 1166-1167.
- 20.<https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/>
- 21.Ye J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction //BMC bioinformatics. – 2012. – Т. 13. – №. 1. – С. 134.
- 22.Visel A. et al. VISTA Enhancer Browser—a database of tissue-specific human enhancers //Nucleic acids research. – 2007. – Т. 35. – №. suppl 1. – С. D88-D92.
- 23.Madden T. The BLAST sequence analysis tool //The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. – National Center for Biotechnology Information (US), 2013.
- 24.Солтынская И. В. и др. Секвенирование ДНК для определения видовой принадлежности мяса //Ветеринария. – 2018. – №. 1. – С. 55-61.
- 25.Bejerano G. et al. Ultraconserved elements in the human genome //Science. – 2004. – Т. 304. – №. 5675. – С. 1321-1325.
- 26.Venkatesh B., Yap W. H. Comparative genomics using fugu: a tool for the identification of conserved vertebrate cis-regulatory elements //Bioessays. – 2005. – Т. 27. – №. 1. – С. 100-107.
- 27.Pennacchio L. A. et al. In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences //Nature. – 2006. – Т. 444. – №. 7118. – С. 499-502.
- 28.Stults D. M. et al. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters //Genome research. – 2008. – Т. 18. – №. 1. – С. 13-18.
- 29.Leonard J. A. et al. Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research // Journal of Archaeological Science. – 2007. – Т. 34. – №. 9. – С. 1361-1366.