

ЗООГИГИЕНА, САНИТАРИЯ, КОРМЛЕНИЕ

УДК 637.04:664.955.2

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2021.4.88

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИКРЫ ЛОСОСЕВЫХ ПОРОД РЫБ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С НАБЛЮДЕНИЕМ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Калюжная Т.В., Орлова Д.А., Родак Г.Н. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: икра, видовая принадлежность, идентификация, ветеринарносанитарная экспертиза, полимеразная цепная реакция с наблюдением в реальном времени

Keywords: caviar, species, identification, veterinary and sanitary expertise, polymerase chain reaction with real-time observation.





РЕФЕРАТ

На сегодняшний день существует множество способов выявления фальсификации икры. К ним относятся органолептические и лабораторные методы исследования. Однако, с помощью этих методов при добавлении фальсификата в размере

до 25 % от общей массы продукта, установить факт фальсификации довольно трудно. Именно поэтому в ветеринарно-санитарной практике все чаще прибетают к полимеразной цепной реакции. Цель исследований заключалась идентификации видовой принадлежности икры лососевых рыб при помощи полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени (ПЦР-РВ). Идентификацию осуществляли в два этапа. На первом этапе икру гомогенизировали с последующей экстракцией ДНК адсорбционным методом, используя набор «Сорб-ГМО-А» (Синтол, Россия). На втором этапе проводили постановку ПЦР-РВ на амплификаторе «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) с помощью тест-систем «Горбуша/Кета/Нерка» (Синтол, Россия) и «Семга/Форель/Кижуч» (Органик-Тест, Россия). Результаты оценивали по кинетической кривой роста сигнала флуоресценции в зависимости от ДНК, присутствующего в исследуемой икре и величине порогового цикла Сt ≤ 35.

Существующие органолептические и физико-химические методы ветеринарно-санитарной экспертизы икры позволяют определить ее качество и безопасность. Установить видовую принадлежность икры, используя эти методы крайне сложно. Наиболее чувствительным методом, позволяющим идентифицировать видовую принадлежность икры и выявить факты ее фальсификации, является полимеразная цепная реакция.

введение.

Одной из важных отраслей аквакультуры Российской Федерации является производство икорной продукции. Икорная продукция – это готовая к употреблению продукция, полученная из икры, гер-

метически упакованная в ту или иную тару. Данный товар, отличаясь высокой стоимостью и уникальной пищевой ценностью, пользуется большой популярностью у населения. Данные обстоятельства закономерно привели к возникновению

такой проблемы, как фальсификация. Преследуя материальные выгоды, недобросовестные предприниматели прибегают к различным видам фальсификации: количественной, информационной, ассортиментной и качественной [1, 3].

На сегодняшний день существует множество способов выявления фальсификации икорных продуктов. К ним относятся органолептические и лабораторные методы исследования [2, 4]. Из всего вышеперечисленного наиболее часто прибегают к органолептическим методам исследования, оценивая вкус, цвет, запах, консистенцию, наличие посторонних включений и икринок-лопанцев [5]. Однако, при добавлении фальсификата в размере до 25 % от общей массы продукта, установить факт фальсификации довольно трудно. Именно поэтому В ветеринарносанитарной практике все чаще прибегают к полимеразной цепной реакции. Преимущества данного метода заключаются в том, что он позволяет выявить фальсификацию по наличию ДНК не свойственной данному виду икры. При этом количество добавляемого фальсификата не имеет значение.

Цель исследований заключалась идентификации видовой принадлежности икры лососевых рыб при помощи полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени (ПЦР-РВ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе паборатории молекулярно-генетических исследований ФГБУ «Ленинградская МВЛ». Материалами исследования служили 30 образцов икры: по 5 образцов от икры горбуши, семги, нерки, кижуча, кеты и форели, поступившие в лабораторию.

Видовую идентификацию проводили в два этапа. На первом этапе исследуемые образцы подвергались гомогенизации с последующим выделением ДНК. Для измельчения проб икры использовали мельницу с одноразовыми размольными контейнерами TUBE MILL control (IKA, Германия). Выделение нуклеиновой кислоты проводили адсорбционным методом с

использованием набора «Сорб-ГМО-А» («Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией, прилагаемой к нему. В качестве реагента для очистки в наборе «Сорб-ГМО-А» используется кремниевый сорбент, а в качестве лизирующего гуанидин хлорид.

На втором этапе проводили постановку ПЦР - РВ с помощью амплификатора «Rotor - Gene Q» (Qiagen, Германия), используя тест-системы «Горбуша/Кета/ Нерка» (Синтол, Россия) и «Семга/ Форель/Кижуч» (Органик-Тест, Россия). В состав данных тест-систем входят две пробирки реакционной смеси по 0,55 мл в каждой, в составе которой имеются праймеры охватывающие искомый участок ДНК с двух концов. Так, реакционная смесь тест-системы «Горбуша/Кета/ Нерка» имеет олигонуклеотидные праймеры, соответствующие специфическому фрагменту ДНК горбуши, олигонуклеотидные праймеры, соответствующие специфическому фрагменту ДНК кеты, олигонуклеотидные праймеры, соответствующие специфическому фрагменту ДНК нерки, и олигонуклеотидные праймеры, соответствующие специфическому фрагменту ДНК рыб. Так же в состав тест систем входят по одной пробирке с SynTaq ДНК - полимеразой в количестве 0,025 мл, с положительным контрольным образцом (ПКО) в количестве 0.05 мл и с отрицательным контрольным образцом (ОКО) в количестве 0,2 мл.

Для постановки реакции использовали программу амплификации со следующими параметрами: первичная денатурация: 950С — 5 мин; 40 циклов: 950С — 15 с; 600С — 40 с.

Учет результатов осуществляли отдельно по наличию кинетической кривой роста сигнала флуоресценции каждого из каналов в зависимости от используемой тест системы (Рисунок 1). При использовании тест-системы «Горбуша/Кета/ Нерка» результат оценивается по четырем каналам:

Канал флуоресценции FAM/Green, позволяющий определить специфический фрагмент ДНК горбуши (Oncorhynchus gorbuscha).

Канал флуоресценции R6G/HEX/JOE/ Yellow, позволяющий определить специфический фрагмент ДНК кеты (Oncorhynchus keta).

Канал флуоресценции ROX/Orange, позволяющий определить специфический фрагмент ДНК нерки (Oncorhynchus nerka).

Канал флуоресценции Cy5/Red, позволяющий определить специфический фрагмент ДНК рыб.

При использовании тест-системы «Семга/Форель/Кижуч» результат оценивается по трем каналам:

Канал FAM/Green, по которому определяется наличие в исследуемых образцах ДНК радужной форели (Oncorhynchus mykiss).

Канал R6G/Yellow, по которому определяется наличие в исследуемых образцах ДНК семги (Salmo salar).

Канал ROX/Orange, по которому определяется наличие в исследуемых образцах ДНК кижуча (Oncorhynchus kisutch).

Критерием регистрации роста сигнала флуоресценции по каналу является величина порогового цикла Сt, которая означает любую величину, не превышающую значение 35. Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Rotor-Gene 1.8.17.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований было установлено наличие видовой фальсификации в исследуемых образцах икры лососевых пород рыб. Анализируя данные представленные в таблице 1 установили, что в образце икры кеты № 1, помимо ДНК кеты, были выявлены ДНК форели и горбуши; в образце икры кеты № 2 – ДНК кеты и горбуши; в образце икры кеты № 3 – ДНК кеты и форели. В образцах №1 и 2 икры нерки помимо ДНК нерки выявлена ДНК горбуши. В образце № 5 икры нерки помимо ДНК нерки обнаружена ДНК горбуши и форели. В образце икры форели № 3 обнаружили ДНК форели, нерки, горбуши. В образце икры семги № 2 обнаружили ДНК горбуши и семги. В образце №3 икры кижуча обнаружена ДНК кижуча, гор-

буши. Остальные образцы содержали только свою, характерную для данного вида икры, ДНК. Наличие в образцах икры ДНК не характерной для данного вида икры, свидетельствует о видовой фальсификации. Анализируя данные представленные в таблице 1 установили, что в образце икры кеты № 1, помимо ДНК кеты, были выявлены ДНК форели и горбуши; в образце икры кеты № 2 – ДНК кеты и горбуши; в образце икры кеты № 3 – ДНК кеты и форели. В образцах №1 и 2 икры нерки помимо ДНК нерки выявлена ДНК горбуши. В образце № 5 икры нерки помимо ДНК нерки обнаружена ДНК горбуши и форели. В образце икры форели № 3 обнаружили ДНК форели, нерки, горбуши. В образце икры семги № 2 обнаружили ДНК горбуши и семги. В образце №3 икры кижуча обнаружена ДНК кижуча, горбуши. Остальные образцы содержали только свою, характерную для данного вида икры, ДНК. Наличие в образцах икры ДНК не характерной для данного вида икры, свидетельствует о видовой фальсификации.

выводы

Существующие органолептические и физико-химические методы ветеринарносанитарной экспертизы икры позволяют определить ее качество и безопасность. Установить видовую принадлежность икры, используя эти методы крайне сложно. Так, по цвету, размеру и внешнему виду икринок можно лишь косвенно судить о ее видовой принадлежности, учитывая подмешивание в небольших объемах одного вида икры лососевых пород рыб к другому. Наиболее чувствительным методом, позволяющим идентифицировать видовую принадлежность икры и выявить факты ее фальсификации, является полимеразная цепная реакция.

IDENTIFICATION OF SALMON CAVI-AR USING PCR-RV. Kalyuzhnaya T.V.— PhD of Vet. Scie., Associate Professor; Orlova D.A.—PhD of Vet., Scie., Associate Professor, Rodak G. N.—student Faculty of Veterinary and Sanitary Expertise (St. Petersburg State University of Veterinary Medicine).

езультаты ПЦР-РВ

Таблица 1

	Результаты ПЦР-РВ								
Ha	№ образца	Результат ПЦР по каналу							
ИМ		Тест система «Горбуша/Кета/Нерка»				Тест система «Семга/Форель/Кижуч»			
ен ов ан ие об- раз ца		FAM/ Green	ROX/ Orange	R6G/ HEX/ JOE/ Yellow	Cy5 / Red	FAM/ Green	ROX/ Orange	R6G/HEX/ Yellow	
		ДНК горбуши	ДНК нерки	ДНК кеты	ДН К рыб	ДНК форели	ДНК кижуча	ДНК семги	
	1	28,67	Не обна-	22,19	19,3 2	29,19			
Ик ра ке-	2	27,95		21,70	19,1	Не обна- ружено			
	3		ружено	22,32	19,2	27,41	Не обнаружено		
ТЫ	4	Не обна-		22,01	19,4	Не обна-			
	5	ружено		23,15	20,3 1	ружено			
Ик	1	22,04			19,3 9				
pa ro	2	22,21	Необнарух	кено	19,4 2	Не обнаружено			
рб уш	3	21,37] "		20,4				
и	4	22,56			21,3				
	5	21,94		1	20,5				
Ик ра не рк и	1	27,59	22,91	Не обна- ружено	19,1	Не обна- ружено	Не обнаружено		
	2	28,93	23,79		20,6				
	3	Не обна-	22,17		19,3				
	4	ружено	23,11		20,2 5				
	5	28,71	21,67		19,2	27,95			
Ик ра	1				18,4	18,93			
	2	Не обнаружено		Необна-	18,6 3	20,13			
фо pe	3	27,72	26,81	ружено	23,1 4	20,03	Необнару	ружено	
ЛИ	4	Не обнаружено			18,1	18,75			
	5				19,6	20,11			
Ик ра се мг и	1	Не обна-			19,3		22,04		
		ружено	4		5			•	
	2	27,46	Цасбит	сено	23,4	Не обнаружено		23,41 21,38	
	3	Не обна-	Необнаруж		19,8 20,1			19,63	
	5	ружено			19,7		22,71		
	1	+			19,5		23,19		
Ик ра	2	Не обна- ружено			19,2	Не обна- ружено	21,82		
ки-	3	29,25	Необнаруя	кено	25,8		23,97	Не обнаружено	
жу	4	Не обна-	†		20,2		21,93	1	
ча	5	ружено			19,1		19,39		

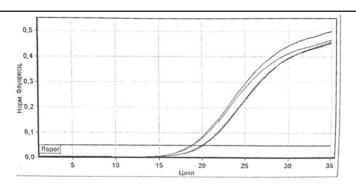


Рис.1. Рост сигнала флюоресценции по каналу FAM/Green (ДНК горбуши).

ABSTRACT.

To date, there are many ways to detect the falsification of caviar. These include organoleptic and laboratory research methods. However, when adding counterfeit in the amount of up to 25% of the total weight of the product, it is quite difficult to establish the fact of falsification. That is why in veterinary and sanitary practice, polymerase chain reaction is increasingly resorted to. The purpose of the research was to identify the species of salmon fish eggs using polymerase chain reaction with real-time observation (PCR-RV). Identification was carried out in two stages. At the first stage, the eggs were homogenized with subsequent DNA extraction by the adsorption method using a set of "Sorb-GMO-A" (Syntol, Russia). At the second stage, PCR-RV was performed on the Rotor-Gene Q amplifier (Qiagen, Germany) using the Pink Salmon/Chum Salmon/ Sockeye Salmon (Syntol, Russia) and Salmon/Trout test systems/Kizuch" (Organic Test, Russia). The results were evaluated by the kinetic growth curve of the fluorescence signal depending on the DNA present in the studied caviar and the threshold cycle value $Ct \leq .35$.

The existing organoleptic and physicochemical methods of veterinary and sanitary examination of caviar make it possible to determine its quality and safety. It is extremely difficult to determine the species of caviar using these methods. Polymerase chain reaction is the most sensitive method for identifying the species of caviar and revealing the facts of its falsification.

ЛИТЕРАТУРА

1.Калюжная, Т. В. Ветеринарносанитарная экспертиза икорных продуктов / Т. В. Калюжная, Д. А. Орлова, Г. Н. Родак // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2021. — № 2. — С. 133-136. — DOI 10.17238/ issn2072-6023.2021.2.133.

2.Кундина Л. Ю. Идентификация и выявление фальсификации икорных товаров на региональном продовольственном рынке // Вестник СамГУПС. — 2020. — №. 1. — С. 9-18.

3.Серегин И. Г., Никитченко Д. В., Михеева. М. И. Совершенствование ветсанэкспертизы икры лососевых рыб // Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. 2017. Т. 12. № 3. С. 279–288.

4. Турчинская А. В. Идентификация и фальсификация икорной продукции // Современные проблемы теории и практики сервисной деятельности. – 2017. – С. 230-234.

5.Шмат Е.В. Фальсификация икры и ее выявление с помощью органолептических методов // Инновации в науке. –2016. –№ 6- С. 78—85.