

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
**«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ И. Е. Ямских  
подпись                      инициалы, фамилия

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Разработка универсального метода определения видовой  
принадлежности мяса животных, птицы, рыбы в пищевой  
продукции  
тема

06.04.01 «Биология»  
код и наименование направления

06.04.01.06 «Геномика и биоинформатика»  
код и наименование магистерской программы

Руководитель	_____	<u>с.н.с., к.б.н.</u>	<u>М. Ю. Трусова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Н. В. Шароватова</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>с.н.с., к.б.н.</u>	<u>В. В. Красицкая</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск, 2023

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация «Разработка универсального метода определения видовой принадлежности мяса животных, птицы, рыбы в пищевой продукции» состоит из введения, 3 глав, заключения, списка использованных источников. Работа изложена на 57 страниц текстового документа, содержит 8 таблиц, 11 рисунков, 57 использованных источников.

Ключевые слова:

ПИЩЕВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, БИОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ, МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР, МЯСНАЯ ПРОДУКЦИЯ, РЫБНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Объектом исследования была коллекция из 40 образцов различных изделий мясной и рыбной продукции, купленных в магазинах розничной торговли на территории города Красноярск

Цель работы: разработка универсального метода для одновременной идентификации трех часто употребляемых видов мяса (говядина, свинина, курица), а также рыбы тресковых пород в составе продуктов различной степени термообработки.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Собрать коллекцию образцов из мясных изделий, выделить геномную ДНК из каждого продукта и провести оценку ее качества и количества.
2. Опробовать на коллекции образцов пищевой продукции метод мультиплексной ПЦР и аннотировать результаты анализа.
3. Провести HRM-анализ на коллекции образцов.
4. Сравнить два проведенных метода идентификации видового состава продуктов и выявить наиболее удобный, эффективный и выгодный среди них.

## СОДЕРЖАНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
1.1 ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ.....	7
1.2 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ, ОСНОВАННЫЕ НА АНАЛИЗЕ ДНК	9
1.2.1 МЕТОД СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	9
1.2.2 МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ .....	13
1.2.2.1 МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПОЛИМОРФИЗМЕ ДНК.....	15
1.2.2.1.1 АНАЛИЗ СЛУЧАЙНО АМПЛИФИЦИРУЕМОЙ ПОЛИМОРФНОЙ ДНК.....	15
1.2.2.2.2 АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИН РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ.....	16
1.2.2.1.3 АНАЛИЗ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО КОНФОРМАЦИОННОГО ПОЛИМОРФИЗМА .....	18
1.2.2.2 ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	19
1.2.2.3 АНАЛИЗ КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ .....	20
1.2.2.4 МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР .....	21
1.3 ВЫБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ДНК.....	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	25
2.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
2.2 . ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК.....	27
2.3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДНК.....	28
2.4. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ.....	28
2.5. ПРОВЕРКА СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР .....	29
2.6. МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР .....	31
2.7 ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК МЕТОДОМ ФЛУОРИМЕТРИИ .....	31
2.8. ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ HRM .....	32
3.1 ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК.....	34
3.2. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ДНК ..... <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>	

3.3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР .....	Ошибка! Закладка не определена.
3.4. ОЦЕНКА ВИДОВОГО СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ..	Ошибка! Закладка не определена.
3.5. ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРИМЕТРИИ .....	Ошибка! Закладка не определена.
3.6. HRM-АНАЛИЗ .....	Ошибка! Закладка не определена.
3.7. ТЕСТ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ .	Ошибка! Закладка не определена.
3.8. АНАЛИЗ СМЕСЕЙ ДНК С ПОМОЩЬЮ HRM	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	36
Список сокращений .....	38
Список источников .....	39

## ВВЕДЕНИЕ

Идентификация видов животных в пищевой продукции имеет первостепенное значение для контроля качества, обеспечения безопасности и защиты потребителей. Случаи несоответствия состава пищевого продукта, заявленного на этикетке становятся все более частыми, что приводит к всплескам беспокойства потребителей. Главным образом это происходит из-за желания производителей увеличить свою прибыль, несмотря на обязанность очень точно указывать все применяемые ингредиенты на упаковке. Фальсификация пищевых изделий представляет серьезную проблему как по экономическим соображениям, так и по религиозным, моральным возражениям, а также из-за индивидуальной непереносимости или аллергии потребителей на определенные компоненты продукта. Кроме того, существует вероятность возникновения правовых проблем, связанных с незаконным использованием видов, находящихся под угрозой исчезновения. Таким образом, обеспечение подлинности используемого пищевого сырья необходимо для защиты прав и здоровья потребителей, а также для выявления юридическими органами незадекларированных ингредиентов и сертификации продукции.

К сожалению, распознать фальсификацию по внешним характеристикам не удастся большую часть случаев, особенно если это касается обработанной продукции, подвергшейся различным технологическим процессам. К таким процессам относится измельчение сырья, смешивание с другими ингредиентами, термическая обработка, и все они лишают мясо его специфичных морфологических признаков. Поэтому разработка методов, позволяющих количественно и качественно идентифицировать отдельные ингредиенты, особенно актуальна.

Для проверки и предотвращения мошенничества был разработан ряд современных молекулярных методов идентификации видовой принадлежности, которые в основном подразделяются на анализ ДНК или

белка. Анализы ДНК используются в диагностике пищевых продуктов более широко из-за высокой чувствительности и применимости к образцам, прошедшим какую-либо обработку. На сегодняшний день разработано множество методов для идентификации, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР), различные анализы, основанные на полиморфизме ДНК, а также метод гибридизации и секвенирования ДНК и т.д. Одним из перспективных практичных методов является метод ПЦР, которая обеспечивает простое и специфичное обнаружение более одного вида. Стоит учитывать также такие достоинства как доступность и низкая стоимость воспроизведения метода в лаборатории.

Таким образом, целью данной работы являлся разработка универсального метода для идентификации трех часто употребляемых видов мяса (говядина, свинина, курица), а также двух видов рыб семейства Тресковых (треска, минтая) в составе продуктов различной степени термообработки.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Собрать коллекцию образцов из мясных изделий, выделить геномную ДНК из каждого продукта и провести оценку ее качества и количества.
2. Опробовать на коллекции образцов пищевой продукции метод мультиплексной ПЦР и аннотировать результаты анализа.
3. Провести HRM-анализ на коллекции образцов
4. Сравнить два проведенных метода идентификации видового состава продуктов и выявить наиболее удобный, эффективный и выгодный среди них.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

Одной из процедур, которая обязательно должна быть выполнена при сертификации продовольственных продуктов, является идентификация. Этот процесс заключается в проверке соответствия характеристик продукции, указанных на маркировке, требованиям нормативных и технических документов. Методы идентификации можно разделить на две категории: органолептические и физико-химические.

В органолептических методах часто используется морфологическая идентификация с помощью сенсорной оценки формы, цвета, запаха и текстуры, а также микроскопического исследования структуры и расположения тканей. Однако, хоть такой подход является простым и экономически эффективным, точность анализа будет сильно зависеть от опыта и навыков. Фактически, эти подходы редко полезны для продуктов с высокой степенью обработки, а также мало пригодны для различия между близкородственными заменителями.

С развитием технологий исследователями стали использоваться методы на основе анализа белка: электрофоретические, иммунологические и хроматографические методы, иногда поддерживаемые методом масс-спектрометрии.

Электрофоретические методы - одна из самых первых групп методов, используемых для идентификации мясной продукции, поскольку мясо представляет собой тканевые смеси, построенные в основном из белков. Методы применяются для растворимых белков (особенно саркоплазматических белков) и в основном только на образцах из сырого мяса. К этой группе относят: метод изоэлектрического фокусирования, электрофорез в полиакриламидном геле и двумерный электрофорез.

Ограничениями этих методов является как сам состав белка, который может варьироваться в зависимости не только от вида, но и от многих других

факторов, включая тип ткани, время хранения продукта и используемых технологических процессов. Эту группу методов также характеризует низкая надежность, недостаточная чувствительность, сложность интерпретации гелей [1–3].

Методы идентификации видов на основе оценки белка также могут быть достигнуты с помощью различных хроматографических методов. Их основным принципом является разделение смеси веществ на отдельные компоненты на основе определения свойств данного компонента (белка), а затем измерения его количества. Для идентификации мяса использовались: высокоэффективная жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез [4]. Последний сочетает в себе такие методы, как электрофорез и хроматографию, и является достаточно чувствительным для анализа белка. Однако, вдобавок к тому, что проведение анализа требует дорогостоящего оборудования, его чувствительности для регулярного выявления фальсификаций мяса недостаточно. Основными недостатками хроматографических методов являются необходимость утомительного извлечения и длительное время анализа, что значительно ограничивает широкое использование этого метода [4].

Иммунологические методы основаны на иммуноферментном анализе (ИФА), принцип которого основан на взаимодействии между антителами и антигенами. Подтверждено, что коммерческие наборы ИФА могут быть использованы для идентификации видов животных в обработанных мясных продуктах [5]. Тесты оказались чувствительными, дешевыми и простыми в применении, а также позволили обнаружить небольшие количества свинины, говядины, баранины и птицы в промышленных мясных консервах. Однако весомый недостаток заключается в том, что предел обнаружения может отличаться от продукта к продукту, поскольку он зависит от содержания жира в данном продукте и степени его переработки.

Методы на основе белка имеют одно значимое ограничение – это денатурация белка во время тепловой пищевой обработки, что приводит к



изменениям антигенной активности молекул и их подвижности после электрофореза.

## **1.2 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ, ОСНОВАННЫЕ НА АНАЛИЗЕ ДНК**

Исследователями конца прошлого столетия были открыты новые молекулярные методы на основе ДНК, которые становятся фундаментом для разработки новых специфичных и надежных методов идентификации видов в пищевой продукции. Анализ, основанный на ДНК, имеет существенные достоинства по сравнению с белковыми прежде всего за счет свойства термостабильности ДНК. Это свойство позволяет идентифицировать пищевое сырье, прошедшее сильную термическую обработку и консервацию [6]. Другое преимущество этой группы методов – это повсеместное присутствие ДНК во всех клетках организма, которые несут практически идентичную генетическую информации. Кроме того, из-за вырожденности генетического кода и наличия множества некодирующих областей ДНК предоставляет гораздо больше информации, чем белки.

Выбор наиболее подходящего молекулярного подхода зависит от различных аспектов, включая: количество генетических вариаций анализируемых видов; время, необходимое для анализа; соотношение затрат и эффективности метода; опыт лаборатории.

### **1.2.1 МЕТОД СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

Секвенирование включает в себя группу методов, цель которых – это определение первичной структуры нуклеиновых кислот, т.е. в результате мы сможем получить описание нуклеотидной последовательности в цепи ДНК или РНК. Самым доступным, точным и популярным является метод секвенирования по Сэнгеру, так же известен как метод обрыва цепей. Он

позволяет определить последовательности длиной до 300-1000 пар оснований, отлично подходит для идентификации коротких tandemных повторов, а также секвенирования единичных генов[7].

Метод основан на обычной ПЦР, где одна из цепей анализируемой ДНК будет играть роль матрицы для синтеза комплементарной цепи. Для проведения анализа необходимо четыре реакции ПЦР с одинаковой матрицей в разных пробирках. Каждая пробирка будет содержать: праймер; ДНК-полимеразу; смесь четырех дезоксинуклеотидов (dNTPs), один из которых радиоактивно меченным по  $\alpha$ -положению фосфата ( $P^{32}$ ); дидезоксипроизводное одного из нуклеотидов (ddNTP). Обрыв синтеза цепи достигается за счет отсутствия у ddNTP 3'-гидроксильной группы. В итоге образуется 4 набора фрагментов ДНК разной длины, заканчивающиеся в соответствии с добавленным ddNTP одним и тем же нуклеотидом[8]. Результат реакций разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле и визуализируют с помощью радиоавтографии.

Однако, значительный минус данного метода – это количество его потребляемого времени. Существуют более быстрые приборы для автоматического секвенирования, которые используют флуоресцентные метки вместо радиоактивных, а также систему капиллярного электрофореза. Однако стоимость такого оборудования пока что не является финансово доступным.

Еще одним весомым недостатком метода по Сэнгеру считается неприменимость к смешанным матрицам. Секвенирование может быть легко применено к отдельным продуктам ПЦР, однако, если в реакции образуется больше ампликонов, разделение ампликонов должно быть выполнено до секвенирования, что трудоемко для рутинного диагностического тестирования [9]. Для устранения этой проблемы выгодным решением будет использование мультиплексной ПЦР.

Достаточный уровень мутаций и большая доступность последовательностей в базах данных – это основные характеристики, по

которым гены митохондриального цитохрома b, 12S и 16S рРНК являются наиболее распространенными генетическими маркерами для определения видов с помощью секвенирования. Анализ с использованием праймеров, нацеленных на ген 16S рРНК, оказался быстрым и чувствительным для идентификации крупного рогатого скота, свиньи, козы, овцы, лошади, кролика, курицы, форели и европейской сардины, даже в случае сильной обработке образцов (при 134,4-141,9°C и 3,03-4,03 бар в течение 24 минут) [10]. Секвенирование последовательности амплифицированных фрагментов гена цитохрома b применен для идентификации видов животных в свежих и обработанных образцах неизвестного происхождения [11].

Значительный прогресс в технологии секвенирования продвигается в направлении более надежных, доступных и интегрированных инструментов для идентификации видов [12]. Так был разработан метод ДНК-баркодинг (штрихкодирования), который позволяет по маркерам в ДНК определять принадлежность организма к определённому таксону. ДНК-«штрихкодирование» получило значительную поддержку в качестве быстрого, экономически эффективного и широко применимого метода аутентификации пищевых продуктов. Метод использует праймеры, нацеленные на небольшой стандартизированный фрагмент 650 п.н. в гене митохондриальной цитохромоксидазы I (COI), из которого можно получить эталонную последовательность или «штрих-код ДНК» - молекулярную идентификационную метку для каждого анализируемого вида [13].

Метод «штрих-кодирования» не является полностью инновационным, поскольку базируется на таких основных молекулярных методов, как ПЦР и секвенирование. Однако, имеет преимущество, сочетая три важных пункта: исследование изменчивости ДНК для выделения таксонов, стандартизация процедуры (от забора пробы до анализа молекулярной выходов) и компьютеризация (перенос полученных генетических данных с помощью информатики) [14].

В соответствии с руководящими принципами за последние 10 лет в базы данных NCBI и BOLD было представлено большое количество последовательностей штрих-кодов ДНК животных и растений (включая виды, выращиваемые на фермах)[13]. Наличие высококачественных хранилищ эталонных последовательностей является важным элементом инструмента «штрихкодирования» для установления связи штрих-кода ДНК как с подтвержденным образцом, так и с другими последовательностями ДНК, принадлежащими к одному и тому же или разным таксонам.

ДНК-баркодинг активно применяется для обнаружения фальсификаций рыбных продуктов, так в 2018 году было оценено 283 образца из 180 точек массового питания из 23 европейских стран [15]. Молекулярная идентификация на видовом уровне была успешна для 97% образцов. Универсальные праймеры COI использовались для всех протестированных образцов, но они оказались неэффективными для видов тунца и головоногих моллюсков. В прочем обойти это исключение помогла амплификация гена цитохрома b. С помощью «штрих-кодирования» на наличие фальсификаций был исследован рынок мяса дичи в США, результат тестирования успешно определил генетическое сходство с видами из баз данных для большинства образцов[16]. Многие исследования ДНК-баркодинга на образцах млекопитающих опираются на один и тот же протокол, который описывает три методики в зависимости от области применения [17].

Комбинация методов «штрих-кодирования» ДНК и ПЦР в режиме реального времени может служить отличным подходом для идентификации в многокомпонентном мясном сырье. Тестирование такого подхода установило несоответствие главного заявленного компонента в смеси, а также идентифицировать виды в смеси фарша, не заявленные в составе[18].

Полноразмерный баркодинг ДНК нацелен на 650 п.н. COI - такая длина последовательности создает проблему получения штрих-кода из сырья, прошедшего термическую обработку и консервирование. В связи с этим в настоящее время тестируется метод «мини-штрихкода», который

работает с короткой последовательностью ДНК (примерно от 127 до 314 п. н) в полноразмерном штрихкоде и облегчает идентификацию фрагментированной ДНК [19]. Шесть наборов праймеров мини-штрих-кода с фрагментами гена COI от 127 до 314 п. н., использовались для аутентификации широкого спектра обработанных рыбных продуктов на уровне видов или родов[20]. Однако серьезную озабоченность по поводу полезности метода вызывает ограниченная универсальность праймеров и слабая дискриминационная способность на более низком таксономическом уровне.

### **1.2.2 МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - это быстрый ферментативный метод *in vitro*, суть которого заключается в амплификации одной или нескольких определенных фрагментов ДНК, увеличивая их число копий на несколько порядков величин [21]. Амплификация основана на способности ДНК к репликации – молекулярному процессу, приводящему к удвоению молекулы ДНК. Синтез новой цепи основан на принципе комплиментарности, то есть последовательность синтезируемой цепи задается последовательностью комплементарных оснований матричной цепи. Для того, чтобы задать процесс направленной репликации в конкретном участке двухнитевой ДНК, необходимо маркировать его специальными праймерами. Это позволяет добиться синтеза новых комплементарных цепей только в определенном интересующем нас участке, а не по всей последовательности ДНК-нитей.

Праймерами для ПЦР являются искусственно синтезированные олигонуклеотиды, идентичные противоположным концам двум матричным цепям анализируемого участка ДНК. Они служат затравкой для главного фермента реакции – термостабильной ДНК-полимеразы. А также играют основную роль в образовании копий ампликона – продукта ПЦР-

амплификации, который является необходимым для анализа фрагментом ДНК. Праймеры должны быть правильно подобраны и отвечать ряду критериев для точности и чувствительности тест-системы: 1) они должны быть специфичными; 2) иметь область связывания праймера с цепью ДНК не в зоне образования мутаций; 3) не должны образовывать димеры и петли [22].

В цикле амплификации – направленной репликации необходимого участка ДНК, разделяют три этапа: денатурацию, отжиг и непосредственно синтез цепей (элонгацию). Первый этап заключается в расплетении цепей ДНК-матрицы, то есть в разрыве водородных связей между комплементарными основаниями двух нитей. Далее происходит связывание специфичных праймеров с каждой разъединенной цепью-матрицы на границах анализируемого участка, которое называется отжигом. Комплекс праймер-матрица создает условие для присоединения ДНК-полимеразы и дает начало заключительному этапу цикла – синтезу (достраиванию) цепей фрагмента. Затем цикл повторяется заново, а число ампликонов увеличивается по формуле  $2^n$ , где  $n$  – число произведенных циклов. Переходу от одного этапа к другому способствует изменение температурного режима амплификатора – специального прибора, с помощью которого в настоящее время проводят процедуру [21,22].

Постановка ПЦР также состоит из таких стадий, как: выделение анализируемой ДНК, амплификации и детекции результатов. Выделение или экстракцию нуклеиновых кислот (НК) производят по различным методикам в зависимости от типа НК и вида исследуемого материала. Это важнейшая стадия всего анализа, которая требует точного соблюдения протокола. Наличие в выделенной НК посторонних веществ может стать причиной ингибирования реакции и получения ложных некорректных результатов [23].

Детекция продуктов амплификации чаще всего производится за счет электрофоретического разделения в фрагментов ДНК в агарозном или полиакриламидном геле. Гель содержит бромистый этидий, который

образует светящийся при ультрафиолете (УФ) комплекс с ДНК. Результат в виде светящихся полос смотрят на трансиллюминаторе (прибор-источник УФ) [22].

ПЦР-анализ имеет широкий потенциал применения из-за высокой чувствительности, экономичности, точности и простоты проведения процедуры [24]. Амплификация фрагментов ДНК с последующей электрофоретической детекцией для проверки размера фрагментов является простейшей стратегией ПЦР, применяемой для оценки присутствия вида в продукте. Однако помимо стандартной ПЦР есть методики проведения анализа в режиме «реального времени» (англ. Real-time PCR), не использующие метод гель-электрофореза. Другой модификацией является мультиплексная ПЦР, получившая такое название из-за возможности амплификации нескольких фрагментов одновременно.

#### **1.2.2.1 МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПОЛИМОРФИЗМЕ ДНК**

Дополнительные методы исследования продуктов ПЦР могут быть выполнены путем анализа: 1) полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (англ. Restrictions fragment length polymorphism - RFLP), 2) случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (англ. Random Amplified Polymorphic DNA – PCR-RAPD), 3) одноцепочечного конформационного полиморфизма (англ. Single-strand conformation polymorphism – SSCP).

Далее рассмотрим методы фрагментарного анализа ДНК, которые осуществляются с помощью стандартной ПЦР и применяются в области идентификации видов в пищевой продукции.

##### **1.2.2.1.1 АНАЛИЗ СЛУЧАЙНО АМПЛИФИЦИРУЕМОЙ ПОЛИМОРФНОЙ ДНК**

Метод RAPD заключается в амплификации фрагментов ДНК с использованием короткого праймера (10-12 н.) с произвольной нуклеотидной последовательностью с низкой температурой отжига. Праймер связывает несколько мест на геномной ДНК, с последующим разделением амплифицированных фрагментов на основе их размеров с использованием гель-электрофореза. Образцы идентифицируются путем сравнения полос ДНК на геле, которые будут соответствовать одному и тому же праймеру ДНК и используемым экспериментальным условиям[25].

RAPD характеризуется как быстрый и дешевый способ оценить различия между особями и популяциями без использования сложных аналитических этапов, таких как рестрикция ДНК или секвенирование. Произвольные короткие праймеры не требуют информации о подлежащих амплификации генов[26]. Однако из-за высокой чувствительности к условиям реакции (температура, количество циклов или концентрация реагентов) не является надежным методом. Его применение ограничено в обработанном мясе с сильно деградированной ДНК. Кроме того, из-за неспецифичности реакции ПЦР технология RAPD не подходит для идентификации целевого организма в мясных смесях, содержащих более одного вида[26].

#### **1.2.2.2 АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИН РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ**

RFLP – это метод исследования геномной ДНК, при котором амплифицированный фрагмент разрезается эндонуклеазами, распознающими специфические сайты рестрикции. Полиморфные сайты рестрикции несут переменные последовательности в аналогичных генах близкородственных видов организмов, за счет чего и происходит их дифференцировка. В результате процедуры из ампликона образуются несколько меньших фрагментов разного размера, их визуализация происходит с помощью гель-



электрофореза[27]. Для каждого вида полоса с отпечатком ДНК на геле будет уникальна, и в зависимости от использованных ферментов их структура будет варьироваться при визуализации.

Подбор ферментов и разработка праймеров очень важны для этого метода. Можно использовать комбинацию из эндонуклеаз или всего один фермент рестрикции. В качестве гена-мишени выбирают в большинстве случаев митохондриальный ген цитохрома b или 12S рРНК [28].

Метод RFLP был применен для прямой и быстрой идентификации видов крупного рогатого скота, свиней, овец, кур, индюков, кроликов, зайцев, собак, кошек, лани, олени, косули и зубра и обнаружения фальсификации в продуктах [29]. Был разработан анализ для дифференциации свежей и переработанной продукции из мяса птицы, в том числе термически обработанных при 120°C течение 30 минут [30]. Также анализ RFLP получил значительное признание как дешевый и быстрый метод для идентификации рыб и головоногих моллюсков в продукции, подвергшейся различной обработке [31]. Подавляющее большинство исследований показал RFLP как качественный метод, который лучше всего работает на однокомпонентных образцах, поскольку результаты детекции смеси нелегко интерпретировать[24].

Однако RFLP требует соответственно оборудованной лаборатории, строгого соблюдения аналитических методов и дорогостоящих ферментов. Также применение метода имеет ограничение из-за использования для идентификации место рестрикции выбранного фермента, несмотря на то, что многие другие области различаются по всему гену [32]. Этот недостаток может исправить включением в смесь ферментов дополнительных потенциальных эндонуклеаз, с помощью которых можно было исследовать больше областей.

### 1.2.2.1.3 АНАЛИЗ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО КОНФОРМАЦИОННОГО ПОЛИМОРФИЗМА

Метод основан на взаимосвязи между электрофоретической подвижностью одноцепочечной ДНК и ее свернутой конформацией, которая, отражает последовательность нуклеотидов. Исследуемый образец амплифицируют, и затем продукт ПЦР денатурируют до одноцепочечной формы и подвергают процедуре электрофореза полиакриламидном геле. Любое различие в последовательностях вызовет изменение подвижности молекулы ДНК в геле, что будет визуализироваться в конце процесса детекции в виде специфических полос.

SSCP оказалась успешной для идентификации рыбной продукции многих видов и некоторых видов моллюсков, а также для консервированных видов тунца[33]. Также анализ был применен для аутентификации мясных продуктов[34].

Преимущества SSCP по сравнению с другими методами, основанными на ПЦР, включает возможность анализа деградированной ДНК, поскольку короткие фрагменты хорошо подходят для анализа. Также близкородственные виды могут быть точно выделены методом SSCP, так как даже одноосновные изменения в последовательности, вероятно, приведут к различным конформациям, которые могут быть разделены с помощью гель-электрофореза[35].

Несмотря на упомянутые преимущества, на анализ SSCP будут влиять ряд факторов, таких как температура, концентрация глицерина, концентрация геля, буфера, добавление других различных соединений в матрицу геля[36]. Кроме того, эффективность SSCP сильно зависит от последовательности и поэтому может значительно варьироваться от одного фрагмента к другому. Изменения подвижности более коротких фрагментов при примерно одинаковом базовом составе указывают на то, что эффективность SSCP также зависит от размера фрагмента[36]. Поэтому

необходимость выполнения метода в тщательно контролируемых условиях для получения точных и корректных результатов считается наиболее важным ограничением метода SSCP.

### **1.2.2.2 ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

Посредством этого вида ПЦР производство продуктов амплификации непосредственно контролируется во время каждого цикла и может быть измерено, когда реакция ПЦР все еще находится в экспоненциальной фазе. Поэтому данную технологию также еще называют количественным методом ПЦР.

Визуализация результатов не нуждается в методе гель-электрофореза, так как накопление продуктов ПЦР фиксируется оптическими датчиками амплификатора в режиме реального времени. В этой ПЦР применяется флуоресцентный метод детекции. Он основан на использование веществ, молекулы которых способны к флуоресценции - это интеркалирующие агенты или системы зондов, меченных флуорохромами.

Интеркалирующие агенты встраиваются между комплементарными азотистыми основаниями двух цепей ДНК, и за счет этого связывания резко усиливают флуоресценцию [37]. Поэтому увеличение ДНК-ампликонов будет пропорционально увеличению испускаемой флуоресценции.

Другой системой обнаружения, используемой в ПЦР в реальном времени, являются олигонуклеотидные гибридизационные зонды, меченные двумя типами флуорохромов – донором (первый флуоресцентный краситель) и акцептором (второй флуоресцентный краситель)[37]. В основе этой системы резонансный обмен энергией между этими двумя фотоактивными группами молекул. Увеличение ДНК в каждом цикле коррелирует с гибридизацией зондов, которая, в свою очередь, пропорциональна увеличению испускаемой флуоресценции[37]. Тремя самыми

распространенными системами меченных зондов являются TaqMan, молекулярные маяки (molecular beacons) и Scorpion [38].

Таким образом, амплификатор для ПЦР «в реальном времени» должен обязательно иметь детекторы, которые способны обнаруживать флуоресцентный сигнал и регистрировать ход ПЦР. Это важно для интерпретации результатов, которые представляются в виде диаграмм и позволяют количественно оценить образец.

Метод известен своей быстротой, применимостью для образцов с разной степенью пищевой обработки, точностью до 0,1 пг и надежностью [4]. Одновременная детекция и количественное определение амплифицированной ДНК – это безусловное преимущество такого метода ПЦР. Благодаря тому, что детекция и амплификация ПЦР-продукта происходит в одной пробирке риск контаминации минимизирован, что нельзя сказать про метод гель-электрофореза, использующийся в других модификациях ПЦР. Еще одним достоинством является возможность проведения мультиплексной ПЦР для амплификации сразу нескольких последовательностей, это достигается с помощью зондов с разными красителями.

ПЦР «в реальном времени» была протестирована на видах мяса в кормах для домашних животных [39], а также применена для выявления ряда видов мяса, таких как говядина, свинина, баранина, лошадь, курица, индейка и утка[40,41]. В целях идентификации среди рыбной продукции также была применена для некоторых видов трески, лосося, камбалы [42], для рыбных ингредиентов (рыба, рыбная мука и рыбий жир) в коммерческих кормах для домашних животных [43].

### **1.2.2.3 АНАЛИЗ КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

Диагностическая функция ПЦР «в реальном времени» была расширена за счет анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA - англ. High-

Resolution Melting Analysis). HRMA - это мощный метод, который позволяет проводить доступный по цене анализ большого количества образцов за короткое время (около 70 минут), нацеливаясь на очень короткие участки ДНК (100 п.н. или менее) [44]. Анализ выполняется на образцах двухцепочечной ДНК, которая сначала амплифицируется с использованием ПЦР «в реальном времени» перед фазой плавления HRM. Далее процесс HRM включает плавление ампликонов путем постепенного повышения температуры, где ДНК медленно денатурирует при температуре 50-95 °С в сочетании с интеркалирующим флуоресцентным красителем. При достижении температуры плавления две нити ДНК 'расплавляются' друг от друга. Этот процесс сопровождается тем, что постепенно высвобождается флуорофор, и флуоресценция падает. Изменение свечения детектируется оптической системой амплификатора. Учитывая, что профиль плавления зависит от последовательности, длины ампликона и комплементарности нитей, этот метод очень подходит для обнаружения вариантов с одним основанием в коротких фрагментах ДНК.

Кривые плавления, полученные после HRM-анализа, отображаются с флуоресценцией по оси Y и температурой по оси X. Они похожи на графики амплификации ПЦР «в реальном времени», но с заменой температуры на номер цикла. Средняя точка кривой плавления описывается как точка, когда 50% ДНК является двухцепочечной, а 50% - одноцепочечной.

#### **1.2.2.4 МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР**

Мультиплексная ПЦР позволяет одновременно амплифицировать сразу несколько последовательностей, и поэтому является потенциально надежным и чувствительным методом для обнаружения фальсификаций видов в многокомпонентном сырье. Этот метод осуществляется за счет включения в смесь компонентов ПЦР набора специальных праймеров для разных мишеней на исследуемой ДНК.

Создание праймеров является важным моментом, необходимо учитывать гомологию с их целевыми последовательностями нуклеиновых кислот, длину, содержание ГЦ-пар, а также их концентрацию. Высокая эффективность амплификации для всех пар праймеров может быть достигнута схожими оптимальными температурами отжига (длина праймера 18-28 п.н. и содержание ГЦ-пар 45-60 %)[45]. Также решающим фактором будет соотношение праймеров и образца ДНК – слишком высокое или низкое соотношение будет приводить к образованию таких побочных продуктов как димеры праймеров. Праймеры обычно должны быть в молярном избытке  $10^7$  по отношению к ДНК, однако не стоит допускать их концентрацию выше значения  $0.5 \mu\text{M}$  [45].

Мультиплексная ПЦР значительно экономит время и может выполняться за четыре часа от извлечения ДНК до окончательного анализа без использования дорогого оборудования, а также обладает достаточной чувствительностью праймера для участка COX1 гена (ген используют в методе ДНК-штрихкодирования) [46]. Еще одним преимуществом мультиплексной ПЦР является то, что также могут применяться ПЦР-зонды в реальном времени, такие как TaqMan™, что позволяет проводить быстрый количественный анализ, не требующий использования гель-электрофореза [47].

Первые авторы, которые разработали метод мультиплексной ПЦР для определения видов, использовали общие прямые и разные обратные праймеры гена митохондриального цитохрома b (cytb). Им удалось одновременно идентифицировать 5 видов мяса в продуктах однокомпонентного состава [32]. Позже метод был использован для обнаружения фальсификаций мяса жвачных животных, птицы и свинины в смеси фарша и колбасных изделий, результат эксперимента продемонстрировал чувствительность реакции и успешные надежные результаты [48]. Также мультиплексная ПЦР применялась для идентификации некоторых видов рыб[49].

### 1.3 ВЫБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ДНК

Благодаря специально разработанным праймерам стали возможны прямая специфическая идентификация определенных фрагментов ДНК, применяемая для контроля подлинности пищевых продуктов. Преимущество ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров заключается в том, что она полезна для рутинного анализа большого количества образцов, даже в том случае, когда к пищевым продуктам применялись различные методы обработки. Также это позволяет очень точно амплифицировать целевую последовательность из пищевой матрицы, избегая последующего секвенирования или RFLP-анализа.

Выбор гена-мишени является одной из главных задач при дизайне праймеров для амплификации конкретного участка. Для видовой идентификации используются как хромосомные, так и митохондриальные (мт) генетические элементы. Однако большинство протоколов ПЦР нацелены на мт-ДНК из-за ее высокого числа копий на клетку, обеспечивающего низкий предел обнаружения, и ее стабильности, позволяющей анализировать как сырые мясные продукты, так и приготовленные. Еще один плюс мт-генов, в том что они эволюционировали намного быстрее, чем ядерные, поэтому они содержат большее разнообразие последовательностей, облегчающее идентификацию филогенетически родственных видов[50]. Ученными было установлено, что последовательности мт-ДНК, такие как фрагменты гена цитохрома *b* (*cyt b*), субъединицы цитохром с-оксидазы (*coI*), гены 12S и 16S рРНК, NADH-дегидрогеназы, субъединиц АТФазы 8 и 6 оказались весьма полезны в выявлении видовой принадлежности [30,51–53].

Ген субъединицы АТФазы 8 кодирует субъединицу 8 АТФ-синтазы. Субъединица принадлежит к комплексу  $F_0$  большой трансмембранной АТФ-синтазы F-типа. Этот фермент, который также известен как комплекс V, отвечает за последнюю стадию окислительного фосфорилирования в цепи

переноса электронов. Использование этой кодирующей последовательности в качестве мишени показало снижение внутривидовой генетической гетерогенности и относительно низкую степень сохранности среди позвоночных, по сравнению с некодирующими (например, область D-петли). Ген АТФазы 8 хорошо продемонстрировал свои способности для определения ДНК крупного рогатого скота, овец, свиней, курицы в мясных продуктах [54]. Были разработаны праймеры для мультиплексной ПЦР генов субъединицы 8 АТФазы для пяти распространённых видов животных и пяти запрещенных в использовании в пищевой продукции [55]. Установлено, что размеры фрагментов ПЦР, амплифицированных с использованием данных праймеров, могут быть различимы с помощью гель-электрофореза, что значительно упрощает метод и затраты для идентификации вида ингредиента.

Ген цитохрома b, наиболее часто используемый локус для идентификации видов в исследованиях филогенетики и биоразнообразия. У млекопитающих локус *cyt b* обеспечивает точную реконструкцию филогении на уровнях надотряда, отряда и семейства. Этот ген является одним из наиболее тщательно секвенированных генов на сегодняшний день у позвоночных. Белок этого гена функционирует как часть цепи переноса электронов и является основной субъединицей трансмембранных комплексов цитохрома *bc1* и *b6f*. В митохондриях эукариот и у аэробных прокариот данный белок является компонентом комплекса III дыхательной цепи.

Ген *cyt b* продемонстрировал свою эффективность для идентификацию видов животных в пищевых продуктах с использованием методов ПЦР и ДНК-баркодинга. Праймеры для этого гена использовались для дискриминации большого числа пород крупного рогатого скота, для анализа свежих и деградированных мясных субстратов, а также для обнаружения фальсификация неправильно маркированных рыбных продуктов [56,57].



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования послужили 40 образцов, представленных изделиями мясной и рыбной продукции, купленных в магазинах розничной торговли на территории города Красноярск. Все продукты были получены в свежем или замороженном виде и далее хранились в морозильной камере при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для последующего выделения геномной ДНК использовали образец ткани  $\sim 100$  мг, перед ее отбором все продукты подвергались размораживанию при комнатной температуре. Каждый образец ткани был вырезан стерильным скальпелем в ламинарном шкафу и далее перенесен с помощью пинцета в 1,5 мл пробирку.

Таблица 1. Краткое описание собранных образцов

Группа	Наименование	Имя образца	Состав	Маркировка
Котлеты	Биточки "Сливочные"	КТ6	Филе цыпленка - бройлера, кожа куриная	Троекурово
	Котлета из филе бедра и филе грудки	КТ5	Филе грудки, кожа грудки, филе бедра цыплят-бройлеров	Петилинка
	Котлеты "По-киевски"	КТ3	Филе цыпленка-бройлера, кожа цыпленка-бройлера	Троекурово
	Котлеты "филейные"	КТ1	Филе и кожа цыпленка бройлера	Троекурово
	Котлеты куриные "Сочные"	К4	Мясо птиц мех.обвалки, кожа, мясо цыплят	Троекурово
	Купаты "Фирменные"	СОС8	Свинина, животный белок	Красная цена
	Люля-кебаб	КТ2	Мясо цыплят бройлеров мех.обвалки, кусковое мясо цыплят-бройлеров, говядина	Менжинская птицефабрика
Тефтели из цыпленка-бройлера	КТ4	Мясо цыплят бройлеров механической	Менжинская птицефабрика	

Группа	Наименование	Имя образца	Состав	Маркировка
			обвалки	
Колбасы	Колбаса "Оригинальная"	КС8	Свинина, говядина, шпик	Дымов
	Колбаса "Стародворская"	КС2	Курица, свинина, жир говяжий	Стародворье
	Колбаса ароматная	КС7	Шпик, мясо птицы механической обвалки, свинина	Красная цена
	Колбаса из мяса птицы "Московская"	К2	Филе грудки, бедра птицы, шпик	Владимирский стандарт
	Колбаса сервелат австрийский	КС6	Свинина, филе куриной грудки, шпик, фарш из мяса птицы	Атяшево
	Пепперони	КС5	Свинина, шпик, животный белок (говядина, свинина)	Дымов
	Салями "Итальянская"	КС4	Свинина, шпик (возможно ДНК птицы)	Дымов
	Салями "Финская"	КС3	Свинина, шпик, животный белок (говядина, свинина), филе кур	Дымов
	Сервелат "Премиум"	КС1	Курица, свинина	Eat meat
Сосиски	Сосиски «Большая сосиска»	СОС1	Говядина, свинина, мясо птицы	Большая сосиска
	Сосиски	СОС2	Мясо птицы, шпик боковой, свинина, говядина	Eat meat
	Сосиски «Молочные»	СОС3	Мясо птицы, говядина, свинина	Сибирская продовольственная компания
	Сосиски "Баварушки"	СОС4	Свинина, мясо птицы кусковое, , мясо цыпленка-бройлера механической обвалки, говядина	Стародворье
	Сосиски "Гриль-мастер"	СОС5	Свинина, мясо птицы механической обвалки, шкурка свиная, филе грудок куриных, животный белок говяжий	Папа может

Группа	Наименование	Имя образца	Состав	Маркировка
	Сосиски "Докторские"	СОС7	Свинина, филе куриной грудки, мясо птицы механической обвалки, говядина	Атяшево
	Сосиски "Сливочные"	СОС6	Говядина, свинина	Дымов
Пельмени	Хинкали «Кавказские»	П1	Говядина, свинина	"Олимп"
	Пельмени «Домашние»	П2	Говядина, свинина	"Олимп"
	Пельмени "Росторгуевские"	П3	Говядина, свинина	АК росторгуевский
Сырое мясо	Филе говядины	Г1	говядина	Мясничий
	Филе грудки	К1	курица	Алтайский бройлер
	Шницель свиной	С1	свинина	Дальние дали
	Шницель свиной	С1-2	свинина	Рестория
Фарш	Фарш свиной	С3	Свинина	Омский бекон
	Фарш свиной	Ф1	Свинина	Рестория
Мясные закуска	Мясной продукт из свинины	С5	Мясо свиных голов	Мясная ферма
	Шинка "Нежная"	С5-2	Свинина	Светафор
Рыбные продукты	Филе трески	РФ1	Треска атлантическая	Borealis
	Филе минтая	РФ2	Минтай	Командор
	Котлеты из трески	РК1	Треска	Рынок
	Мини-филе из минтая в панировке	РК2	Филе минтая	Chef Polar
	Крабовые палочки(имитация)	РП1	Сурими (фарш рыбный из зоологических видов рыб: желтополосая сардинелла, малоголовый лептуракант)	Columbus

## 2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК

Процедуру выделения ДНК проводили по протоколу Rehbein (2005) с использованием буферов с цетилтриметил аммоний бромидом (СТАВ). Этот метод позволяет эффективно провести экстракцию из очень разных

источников ДНК, например, из пищевой продукции богатой полисахаридами и содержащей в составе большое количество наполнителей.

Метод выделения содержит стандартные этапы:

1. Лизис измельченного кусочка ткани (объемом 0,5 см<sup>3</sup>) с использованием лизирующего буфера №1 (0,8 М NaCl, 0,6 М TrisHCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1,2% w/v СТАВ), 1М раствора DTT и протеиназы К (20 мг/мл).
2. Экстракцию хлороформом, что позволяет избавиться от примеси белков и липидов.
3. Осаждение с помощью буфера №2 (0,05 М TrisHCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1% w/v СТАВ), буфера №3 (1 М NaCl; 0,01 М TrisHCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) и изопропанола.
4. Промывку осадка ДНК в 70% этиловом спирте и дальнейшее хранение при - 20°C в буфере для растворения ДНК №4 (0,01 М TrisHCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0).

### **2.3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДНК**

Концентрация выделенной геномной ДНК определялась с помощью спектрофотометра NanoDrop. Прибор измеряет оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Результат измерений равный 1, соответствует 50 мкг/мл двухцепочечных ДНК. Для выявления примесей белков в растворе, было проанализировано соотношение поглощения растворов на длинах волн 260 и 280 нм.

### **2.4. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**

Качество выделенной ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1,2 % геле агарозы. Протокол выполнения процедуры следующий:

1. Приготовить однократный буфер ТАЕ путем разведения стокового раствора 50xТАЕ.

2. Приготовить 1,2 %-ный агарозный гель. Для этого взять 0,48 г агарозы и 40 мл 1xТАЕ буфера. Нагреть до кипения в микроволновой печи. Остудить до 55 С (колбу такой температуры можно держать рукой не обжигаясь), добавить раствор бромида этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, перемешать и залить в подготовленную форму, стоящую строго горизонтально и с установленной гребенкой.

3. После застывания геля осторожно вынуть гребенку и перенести в электрофорезную камеру, предварительно заполненную 1x ТАЕ буфером.

4. Внести в крайнюю лунку геля ДНК-маркер. Далее смешать анализируемый образец и буфер для внесения в соответствии с концентрацией раствора ДНК и поместить полученную смесь в остальные лунки агарозного геля.

5. Провести электрофорез при 100 В 45-55 минут.

6. Перенести пластину геля на УФ-трансиллюминатор для анализа.

## **2.5. ПРОВЕРКА СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР**

Для воспроизведения метода были использованы пары праймеров, специфичных к участку гена АТРase8 митохондриальной ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы. Выбранные праймеры и ожидаемые размеры продуктов ПЦР приведены в таблице 2.

Таблица 2. Видоспецифичные праймеры для мультиплексной ПЦР трех видов мяса.

<b>Вид</b>	<b>Фрагмент гена</b>	<b>Размер ампликона (п.о)</b>	<b>Последовательность праймера (5' → 3')</b>
------------	----------------------	-------------------------------	--

Вид	Фрагмент гена	Размер ампликона (п.о)	Последовательность праймера (5' → 3')
<i>Bos taurus taurus</i>	EU177862/ 8150–8382 bp	232	5'- AACATGACTGACAATGATCTTATCAATATTC TTGA 5'- ATAGTAGGCTTGGGAATAGTACGATAAGGGT T [55]
<i>Gallus gallus</i>	NC007236/ 9091–9291 bp	200	5'CAATTAAACCCAAACCCATGATTCTCCA 5'GATTCCTAGTAGGCAGGGGCTTGAGAAT [55]
<i>Sus scrofa domestica</i>	FJ237003/ 7785–8085 bp	300	5'- GCCACAAC TAGATACATCCACATGATTCATT AC 5'-TTGTTGGATCGAGATTGTGCGGTT [55]

Проверка специфичности праймеров была проведена с помощью ПЦР с использованием трех образцов ДНК, выделенных из однокомпонентных продуктов - филе мяса курицы, свинины и говядины. Конечная концентрация ДНК в каждом образце составила 100 нг/мкл, исходная концентрация приведена в таблице 3.

Таблица 3. Концентрация образцов ДНК

<b>K01</b>	<b>S01</b>	<b>G01</b>
ДНК <i>Gallus gallus</i>	ДНК <i>Sus scrofa</i>	ДНК <i>Bos taurus</i>
1764 нг/мкл	1277 нг/мкл	1295 нг/мкл

Реакционная смесь объемом 20 мкл имела следующий состав: 1x реакционный буфер (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM dNTPs, 0,075 U/мкл Taq-SE, 0,2 мкМ прямой и обратный праймер, 100 нг/мкл образец ДНК, H<sub>2</sub>O.

Аmplификацию проводили с использованием следующей циклической программы: 5 мин при температуре 94°C, 30 циклов по 30 с при 94 °C, 30 с

при 61°C, 50 с при 72 °C и 10 мин при 72 °C. Результаты амплификации детектировали с помощью гель-электрофореза.

## **2.6. МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР**

Для проведения процедуры мультиплексной ПЦР каждый образец ДНК был разведен до концентрации 100 нг/мл. Реакционная смесь объемом 20 мкл имела следующий состав: 1x реакционный буфер  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,16 mM dNTPs, 0,075 U/мкл Taq-SE полимеразы, 0,2 мкМ прямой и обратный праймер, 100 нг/мкл образец ДНК,  $\text{H}_2\text{O}$ .

Амплификацию проводили в термоциклере Biometra TPersonal (Biometra, Germany) в объеме 20 мкл с использованием следующей циклической программы: 5 мин при температуре 94°C, 30 циклов по 30 с при 94°C, 30 с при 61°C, 50 с при 72°C и 10 мин при 72°C. Результаты амплификации детектировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле (буфер трис-ацетат-ЭДТА) при 100 В в течение 60 минут. Использовали маркер M27 (SibEnzyme, Россия), размер фрагментов от 100 до 3000 п.о. Перед внесением в лунки геля продукты амплификации смешивали с буфером для внесения в расчете 2 мкл на 10 мкл образца.

## **2.7 ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК МЕТОДОМ ФЛУОРИМЕТРИИ**

Концентрация растворов нуклеиновых кислот методом флуориметрии определялась с помощью флуориметра MAXLIFE Fluorimeter 2.0 (МВМ-Диагностик, Россия). В основе метод лежит измерение уровня флуоресценции специфических красителей, специфично связывающихся с молекулами двухцепочечной ДНК. Краситель возбуждается светом длиной волны 468 нм и в комплексе с ДНК испускает свет длиной волны 508 нм, который регистрируется прибором. Использование таких красителей,

способных избирательно взаимодействовать с молекулами ДНК, уменьшает влияние загрязняющих веществ, присутствующих в исследуемом образце (пигментов, биополимеров), на результат количественных измерений. Для калибровки прибора использовали стандартные растворы, концентрации которых составляли 0 нг/мкл и 200 нг/мкл. В каждую пробирку с 1 мкл измеряемого образца добавляли по 200 мкл рабочего раствора для анализа, который содержал в себе дистиллированную воду, 10X буфер и краситель.

## 2.8. ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ HRM

Геном-мишенью для проведения ПЦР в режиме «реального времени» и HRM анализа для мясных и рыбных продуктов послужил фрагмент гена *cyt b* в 148 п.о. и 134 п.о. для мяса и рыбы, соответственно (таблица 4).

Таблица 4. Видоспецифичные праймеры к гену *CytB* для HRM-анализа

Вид	Название	Размер ампликона (п.о)	Последовательность праймера (5' → 3')
<i>Bos taurus</i>	L15601-F	148	5'-TACGCAATCCTACGATCAATTCC 5'-GGTTGTCCTCCAATTCATGTTAG [57]
<i>Sus scrofa</i>	H15748-R		
<i>Gallus gallus</i>			
<i>Gadus morhua</i>	Gad2CytB-F	134	5'-GTAGGTGATGCCTTAGTTCAATG 5'-GGCCTTATTTTCAGTTATTCCTGCA [56]
<i>Theragra</i>	F/Gad1Cytb-R		
<i>chalcogramma</i>			

Реакционная смесь объемом 10 мкл имела следующий состав: прямой и обратный праймер L15601-F/H15748-R или Gad2CytB-F/Gad1Cytb-R в конечной концентрации 0,3 мкМ каждого, 2,5х раствор мастермикса Mas<sup>ZG</sup>MIX-2025 (Dialat, Россия) и геномная ДНК.



Амплификацию для анализа профилей плавления ДНК, выделенной из мяса животных и птицы, проводили при следующих условиях: начальная денатурация при 95°C в течение 2 мин; 32 цикла при 95°C в течение 5 с, 50°C 15 секунд и 72°C 15 секунд. Анализ плавления ДНК проводили после начальной стадии при температуре 95°C 30 с и 60°C 2 мин. Кривую плавления анализировали в диапазоне от 65°C до 95°C с шагом 0,1°C/сек.

Амплификацию ДНК, выделенной из рыбы и рыбопродуктов, проводили при следующих условиях: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин; 37 циклов при 95°C в течение 15 сек, 60°C 15 секунд, 72°C 15 секунд. HRM проводили после начальной стадии при температуре 95°C 1 мин и 70°C 5 мин. Кривую плавления анализировали в диапазоне от 70°C до 95°C с шагом 0,1°C/сек.

ДНК трех видов мяса и двух видов рыбы тресковых пород (минтай, треска) были проанализированы индивидуально, чтобы убедиться в уникальности их профиля плавления и способности к дифференциации. Для каждого вида был проведен тест на чувствительность метода и оценки возможных вариаций профиля плавления в зависимости от концентрации. Для этого ДНК каждого образца анализировали в трех повторностях со следующими количествами: 10 нг, 5 нг, 1 нг.

Кроме того, ДНК двух разных видов были смешаны в равных пропорциях 1:1 для проведения теста на идентификацию видов в составе искусственной смеси и анализа специфичности профиля плавления. Все эти смеси были приготовлены из трех видов анализируемого мяса в трех повторностях со следующими комбинациями: *B. taurus* и *S. scrofa*, *B. taurus* и *G. gallus*, *S. scrofa* и *G. gallus*. Такая же процедура была произведена с двумя видами тресковых рыб *G. morhua* и *T. chalcogramma*. Количество ДНК во всех образцах для этого теста составляло 10 нг. Дополнительно с помощью метода HRM были проанализированы образцы ДНК из коммерческих продуктов, содержащих мясо и рыбу, и сравнены с профилями плавления эталонных генотипов чистых видов.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **3.1 ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК**

Диапазон концентрации ДНК в проанализированных образцах составил от 45 до 2158 нг/мкл, результаты представлены в таблице 5. Важно отметить, что образцы с низкой концентрацией ДНК, которая составила от 45 до 128 нг/мкл, были представлены преимущественно колбасами и сосисками. На такое отличие по сравнению с другими пробами могло повлиять обильное количество различных наполнителей в составе и собственно само количество добавленного мясного сырья в продукт.

Также для выявления примесей белков в растворах нуклеиновых кислот было проанализировано соотношение поглощения растворов на длинах волн 260 и 280 нм, которое составило от 1,85 до 2,08, что говорит о достаточной чистоте выделенной ДНК.

**Изъято в связи с авторскими правами 12 страниц**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентификация видов животных в пищевой продукции имеет важное значение для контроля качества и безопасности, защиты потребителей и предотвращения мошенничества. В связи с технологическими процессами и обработкой продукции, не всегда возможно распознать фальсификацию по внешним характеристикам. Для эффективного контроля разработаны молекулярные методы, включая метод ПЦР, позволяющий идентифицировать ингредиенты в пищевом сырье. В данной работе были исследованы два метода для дифференциации трех видов мяса (курица, свинина, говядина) и двух видов рыбы (треска, минтай) в составе коммерческих пищевых продуктов.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Метод мультиплексной ПЦР оказался эффективным для одновременной идентификации трех видов мяса. Метод был подтвержден на предмет специфичности и применимости для идентификации мясных пищевых продуктов. Он продемонстрировал надежную и простую в реализации процедуру, которая может быть легко внедрена в рутинный лабораторный анализ без специального сложного оборудования.

2. С помощью мультиплексной ПЦР проверен состав 35 образцов, 30 из 35 образцов соответствуют заявленному видовому составу на этикетке продукта. Метод мультиплексной ПЦР пригоден для качественной идентификации трех видов мяса (курятины, свинины, говядины) в продуктах из одно- и многокомпонентного сырья.

3. Была опробована методика HRM-анализа на 10 образцах мясной и рыбной продукции. Данный метод требует дополнительной проработки для идентификации видов в составе продуктов, так как результаты оказались неоднозначными. Однако метод имеет большой потенциал ввиду быстроты

выполнения и возможности не только качественного, но и количественного анализа ДНК мяса и рыбы в пищевой продукции.

## Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УФ – ультрафиолет

dNTPs – дезоксинуклеотиды

HRM, HRMA - анализ кривых плавления высокого разрешения

RAPD - случайно амплифицируемая полиморфная ДНК

RFLP - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

SSCP – одноцепочечный конформационный полиморфизм

МТ-ДНК – митохондриальная ДНК

СТАВ - цетилтриметил аммоний бромид

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Martinez, High resolution two-dimensional electrophoresis as a tool to differentiate wild from farmed cod (*Gadus morhua*) and to assess the protein composition of klipfish / I. Martinez, R. Šližyte, E. Daukšas // *Food Chem. Elsevier.* – 2007. – Vol. 102, Iss. 2. – P. 504–510.
2. Skarpeid, H.J. Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles / H.J. Skarpeid, K. Kvaal, K.I. Hildrum / *Electrophoresis.* John Wiley & Sons, Ltd, – 1998. – Vol. 19, Iss. 18. – P. 3103–3109.
3. Bloemendal H., Jansen K. Analysis of polymeric proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis on one slab in the presence and absence of sodium dodecyl sulfate/ H. loemendal, K. Jansen // *Electrophoresis.* – 1986. – Vol. 7, № 8. – P. 387–388.
4. Alikord M. Species identification and animal authentication in meat products: a review / Alikord M // *J. Food Meas. Charact.* Springer US, – 2018. Vol. 12, № 1. – P. 145–155.
5. Giovannacci I. Species identification of meat products by ELISA / I. Giovannacci // *Int. J. Food Sci. Technol.* John Wiley & Sons, Ltd, – 2004. – Vol. 39, № 8. – P. 863–867.
6. Montowska M. Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis / M. Montowska, E. Pospiech // *Food Rev. Int.* – 2011. – Vol. 27, № 1. – P. 84–100.
7. Бородинов А. Г. В.Е.К. Поколения методов секвенирования ДНК / В. В. Манойлов, И. В. Заруцкий, А. И. Петров // *Научное приборостроение.* – 2020. – Vol. 30, № № 4. – P. 3–20.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences.* – 1977. – Vol. 74, № 12. – P. 5463.
9. Bottero M.T. Animal species identification in food products: Evolution of

- biomolecular methods / M.T. Bottero, A. Dalmaso // *Vet. J. Elsevier Ltd.* – 2011. – Vol. 190, № 1. – P. 34–38.
10. Bottero M.T. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds / Bottero M.T. // *J. Food Prot. J Food Prot.* – 2003. – Vol. 66, № 12. – P. 2307–2312.
  11. Hsieh H. et al. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene // Elsevier.
  12. Kitano T. Two universal primer sets for species identification among vertebrates / T. Kitano // *Int. J. Legal Med.* – 2007. – Vol. 121, № 5. – P. 423–427.
  13. Hebert P.D.N. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species / P.D.N Hebert., S. Ratnasingham, J.R. DeWaard // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci. Royal Society.* – 2003. Vol. 270, – P. 14–33 .
  14. Casiraghi M. DNA barcoding: A six-question tour to improve users' awareness about the method / Casiraghi M. // *Brief. Bioinform.* – 2010. – Vol. 11, № 4. – P. 440–453.
  15. Pardo M.Á. DNA barcoding revealing mislabeling of seafood in European mass caterings / Pardo M.Á. // *Food Control. Elsevier.* – 2018. – Vol. 92. P. 7–16.
  16. Quinto C.A. DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the U.S. commercial market / Quinto C.A., Tinoco R., Hellberg R.S. // *Food Control. Elsevier.* – 2016. – Vol. 59. – P. 386–392.
  17. Ivanova N. V. DNA Barcoding in Mammals / N. V. Ivanova, E.L. Clare, A. V. Borisenko // *Methods Mol. Biol. Humana Press, Totowa, NJ.* – 2012. – Vol. 858. – P. 153–182.
  18. Kane D. Identification of Species in Ground Meat Products Sold on the Identification of Species in Ground Meat Products Sold on the U.S. Commercial Market Using DNA-Based Methods U.S. Commercial Market Using DNA-Based Methods. – 2015.



19. Hellberg R.S. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding / R.S. Hellberg, B.C. Hernandez, E.L. Hernandez // Food Control. Elsevier Ltd.– 2017. – Vol. 80. – P. 23–28.
20. Shokralla S. A DNA Mini-Barcoding System for Authentication of Processed Fish Products / Shokralla S. // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 5.
21. Joshi M. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application / Joshi M., Deshpande J.D. // Int. J. Biomed. Res. – 2011. – Vol. 2, № 1.
22. Гладин Д.П., Дробот И.В., Королок А.М. Полимеразная цепная реакция в микробиологии / Д.П. Гладин, И.В. Дробот, А.М. Королок // Учебно-методическое пособие. – 2020. P. 32.
23. Novoselov M. V. Investigation of methods of DNA extraction from plant origin objects and foods based on them. / M. V Novoselov, K.A. Shevyakova // – 2014. – P. 142–145.
24. Kumar A. Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: A review / A. Kumar // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2015. – Vol. 55, № 10. – P. 1340–1351.
25. El-Jaafari H.A.A. RAPD analysis of three deer species in Malaysia / H.A.A. El-Jaafari // Asian-Australasian J. Anim. Sci. Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. – 2008. Vol. 21, № 9. P. 1233–1237.
26. Fajardo V. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species / V. Fajardo // Trends Food Sci. Technol. Elsevier. – 2010. – Vol. 21, № 8. – P. 408–421.
27. Lockley A.K. DNA-based methods for food authentication / Lockley A.K., Bardsley R.G. // Trends Food Sci. Technol. – 2000. – Vol. 11, № 2. – P. 67–77.
28. Fajardo V. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species / V. Fajardo // Trends Food Sci. Technol. – 2010. – Vol. 21, № 8. – P. 408–421.
29. Girish P.S. Meat species identification by polymerase chain reaction-

- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene / Girish P.S. // *Meat Sci.* – 2005. – Vol. 70, № 1. – P. 107–112.
30. Girish P.S. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species / P.S. Girish // *Vet. Res. Commun. Vet Res Commun.* – 2007. – Vol. 31, № 4. – P. 447–455.
  31. Asensio Gil L. PCR-based methods for fish and fishery products authentication / Gil L. Asensio // *Trends Food Sci. Technol.* 2007. Vol. 18, № 11. P. 558–566.
  32. Murugaiah C. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA / C. Murugaiah // *Meat Sci.* Elsevier Ltd. – 2009. – Vol. 83, № 1. – P. 57–61.
  33. Asensio Gil L. PCR-based methods for fish and fishery products authentication / Asensio Gil L. // *Trends Food Sci. Technol.* Elsevier. – 2007. – Vol. 18, № 11. – P. 558–566.
  34. Csikós Á. Species identification in meat and cheese products by PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and DNA sequencing / Á. Csikós, Á. Tisza, Á. Simon, G. Gulyás, A. Jávorski L.C. // *Anim. Welfare, Ethol. Hous. Syst.* – 2011. – Vol. 7, № 4. – P. 1–4.
  35. Oohara I. Detection of Single Strand Conformation Polymorphisms (SSCPs) on Mitochondrial DNA Fragments between Two Domesticated Strains of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* / I. Oohara // *Fish. Sci.* Blackwell Publishing, – 1997. – Vol. 63, № 1. – P. 151–152.
  36. Hayashi K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA / K. Hayashi // *Genome Res.* 1991. Vol. 1, № 1. P. 34–38.
  37. Hernandez-Rodriguez P., Ramirez A.G. Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations / P. Hernandez-Rodriguez, A.G. Ramirez // *Polym. Chain React.* IntechOpen. – 2012.

38. Seifi M. Overview of Real-Time PCR Principles / M .Seifi // Polym. Chain React. IntechOpen. – 2012.
39. Okuma T.A., Hellberg R.S. Identification of meat species in pet foods using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay / Т.А. Okuma // Food Control. Elsevier. – 2015. – Vol. 50. – P. 9–17.
40. Любкина К.О., Девришова З.С., Преображенская А.С. Белоусов В И . Н.Г. Выявление днк курицы в мясной продукции, реализуемой в москве и московской области методом полимеразной цепной реакции / К.О. Любкина, З.С.Девришова, А.С. Преображенская, В И Белоусов. // Ветеринария Кубани. – 2020. – № 5. – P. 2–5.
41. Jonker K.M. Species identification in meat products using real-time PCR / К.М. Jonker // <http://dx.doi.org/10.1080/02652030701584041>. Taylor & Francis Group. – 2008. – Vol. 25, № 5. – P. 527–533.
42. Hird H.J. Development of real-time PCR assays for the detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*), Atlantic salmon (*Salmo salar*) and European plaice (*Pleuronectes platessa*) in complex food samples / H.J. Hird // Eur. Food Res. Technol. Springer. – 2012. – Vol. 234, № 1. – P. 127–136.
43. Pegels N. Detection of Fish-Derived Ingredients in Animal Feeds by a TaqMan Real-Time PCR Assay / N. Pegels // Food Anal. Methods. Springer Science and Business Media, LLC. – 2013. – Vol. 6, № 4. – P. 1040–1048.
44. Monteiro C.S. A fast HRMA tool to authenticate eight salmonid species in commercial food products / C.S. Monteiro // Food Chem. Toxicol. Pergamon. – 2021. – Vol. 156. – P. 112-140.
45. Parchami Nejad F. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages / F. Parchami Nejad // Eur. Food Res. Technol. – 2014. – Vol. 239, № 3. – P. 533–541.
46. Izadpanah M. Simple and fast multiplex PCR method for detection of species origin in meat products / M. Izadpanah // J. Food Sci. Technol. Springer India. – 2018. – Vol. 55, № 2. – P. 698–703.
47. Marmioli N., Peano C., Maestri E. Advanced PCR techniques in identifying

- food components / N. Marmiroli., C. Peano, E. Maestri // Food Authent. Traceability. Woodhead Publishing. – 2003. – P. 3–33.
48. Ghovvati S. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay / S. Ghovvati // Food Control. Elsevier. – 2009. – Vol. 20, № 8. – P. 696–699.
  49. Rasmussen R.S. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species / R.S. Rasmussen, M.T. Morrissey // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. – 2008. – Vol. 7, № 3. – P. 280–295.
  50. Brown W.M. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution / Brown W.M. // J. Mol. Evol. J Mol Evol. – 1982. – Vol. 18, № 4. – P. 225–239.
  51. Hellberg R.S. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding / R.S. Hellberg., B.C. Hernandez, E.L. Hernandez // Food Control. Elsevier. – 2017. – Vol. 80. – P. 23–28.
  52. Hossain M.A.M. Universal mitochondrial 16s rRNA biomarker for mini-barcode to identify fish species in Malaysian fish products / M.A.M. Hossain // Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. Taylor & Francis. – 2019. – Vol. 36, № 4. – P. 493–506.
  53. Sarri C.. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species / Sarri C.// Food Control. – 2014. – Vol. 43. – P. 35–41.
  54. Colgan S. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal / Colgan S. // Food Res. Int. – 2001. – Vol. 34, № 5. – P. 409–414.
  55. Prusakova O. V. A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species / Prusakova O. V // Meat Sci. Elsevier, – 2018. – Vol. 137. – P. 34–40.
  56. Fernandes T.J.R. DNA barcoding coupled to HRM analysis as a new and simple tool for the authentication of Gadidae fish species / T.J.R Fernandes // Food Chem. Elsevier Ltd. – 2017. –Vol. 230. –P. 49–57.
  57. Lopez-Oceja A. Species identification in meat products: A new screening

method based on high resolution melting analysis of cyt b gene / A. Lopez-Oceja // Food Chem. Elsevier Ltd. – 2017. – Vol. 237. – P. 701–706.

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой



И. Е. Ямских

подпись

инициалы, фамилия

« 23 » июнь 2023г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Разработка метода определения видовой принадлежности мяса  
животных, птицы, рыбы в пищевой продукции

тема


06.04.01 «Биология»

код и наименование направления

06.04.01.06 «Геномика и биоинформатика»

код и наименование магистерской программы

Руководитель



с.н.с., к.б.н.

М. Ю. Трусова

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник



Н. В. Шароватова

подпись, дата

инициалы, фамилия

Рецензент



с.н.с., к.б.н.

В. В. Красицкая

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Красноярск, 2023