

**REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

ISSN 2224-5227

Volume 5, Number 315 (2017), 63 – 68

M.T. Nurgaliyeva, R.N. Kalendar, A.K. Smagulov, Zh.A. Iskakova

Kazakh national agrarian university, Almaty, Republic of Kazakhstan;
National Center of Biotechnology, Republic of Kazakhstan, Astana
meruet79@gmail.com, ruslan.kalendar@mail.ru,
a.k_smagulov@mail.ru, lady.iskakova2015@yandex.kz

**TESTING OF PRIMERS FOR IDENTIFICATION
OF MEAT RAW MATERIALS AND MEAT PRODUCTS
ON THE BASIS OF THE SEQUENCES RETROTRANSPOZONS**

Abstract. In this research it is reported about testing of a combination of primers complementary to trailer sites of retrotransposons with application of the Inter SINE PCR method.

Keywords: Specific falsification, identification of a specific origin of meat, DNA, Inter SINE PCR method, conservative sites of retrotransposons, primers, nucleotide sequence, genome

УДК 612.398.7:577.2

M.T. Нурғалиева, Р.Н. Календарь, А.К. Смагулов, Ж.А. Исакова

Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы, РК;
РГПН Национальный центр биотехнологий КН МОН РК, г. Астана, РК

**ТЕСТИРОВАНИЕ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
МЯСНОГО СЫРЬЯ И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ**

Аннотация. В данном исследовании сообщается о тестировании комбинации праймеров комплементарных концевым участкам ретротранспозонов с применением метода Inter SINE ПЦР.

Ключевые слова: видовая фальсификация, идентификация видового происхождения мяса, ДНК, метод Inter SINE ПЦР, консервативные участки ретротранспозонов, праймеры, нуклеотидная последовательность, геном.

Введение

В последние годы в стране заметно увеличился сбыт фальсифицированных продовольственных, и прежде всего, мясных продуктов как отечественного, так и импортного производства. Проблема видовой фальсификации мяса существует на рынке мясных продуктов, еще более остро – в сети общественного питания.

Принятые в Республике Казахстан законы «О ветеринарии», «О защите прав потребителей», «О безопасности пищевой продукции», направленные на строгое соблюдение конкретных требований к сырью и продукции, еще не обеспечивают полного исключения их фальсификации.

Закон «О техническом регулировании» предусматривает контроль исключительно за соблюдением требований технических регламентов (ст.38), которые в свою очередь устанавливают минимально необходимые требования, обеспечивающие безопасность и единство измерений (ст.18).

Очевидно, что использование баранины вместо говядины или мяса II сорта вместо высшего без соответствующей маркировки – не может быть классифицировано как опасность для жизни и здоровья человека. Хотя подобные действия являются нарушением прав потребителей на достоверную информацию, что противоречит законам «О защите прав потребителей» (ст.25) и «О безопасности пищевой продукции» (ст.12, ст.16) [1-5]

Наиболее перспективными методами для определения видовой принадлежности тканей животного в составе мясного сырья и продуктов, в том числе подвергнутых термической обработке, являются методы ДНК – диагностики, и особенно метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6-8].

К настоящему времени геномы многих эукариот, в том числе и человека, коровы, собаки, кошки, овцы и курицы и других сельскохозяйственных видов, полностью секвенированы. Большая часть исследованных геномов представлена различными типами повторов, существенный вклад в которые вносят ретротранспозоны. Ретротранспозоны – мобильные генетические элементы, которые составляют основную часть генома эукариот. Эти мобильные элементы теоретически могут внедряться в новые участки генома животных по принципу ретротранспозиции «копирование и вставки» через промежуточную стадию обратной транскрипции РНК ретротранспозона.

Особенности последовательностей ретротранспозонов и их огромная копияность и представленность во всех геномах позволяет использовать эти последовательности для видовой идентификации.

Подбор ПЦР праймеров для выявления ДНК к конкретному организму необходимо проводить на уникальном для данного вида последовательности конкретного ретротранспозона. Тогда как для детекции межвидовой принадлежности ДНК, необходимо использовать ПЦР праймеры для консервативных участков. Так для детекции ДНК в мясных продуктах принадлежащих разным организмам можно применить амплификацию для уникальных последовательностей ретротранспозонов, используя последовательности из консервативных участков. Эти различия можно детектировать с помощью электрофореза или с помощью флуоресцентных проб в ПЦР реального времени [9-15].

Для внедрения в казахстанскую практику молекулярно - генетических методов анализа сырья, продуктов питания и кормов необходимы их адаптация к конкретным объектам исследований, разработка простых и доступных модификаций и создание на их основе доступных экспресс тест-систем. Таким образом, крайне важной и актуальной становится необходимость применения надежных методов идентификации видового состава мясных продуктов и возможность его внедрения в лабораторную практику как метода, контролирующего качественные показатели сырья и готовой мясной продукции.

Материалы и методы

Исследования были проведены в РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК на базе лаборатории геномики растений и биоинформатики (г. Астана).

Материалом исследования являются образцы охлажденного и замороженного мяса соответствующих видов животных (говядина, конина, свинина, баранина, курица), мясные продукты (колбасы, сосиски, фарш) которые были приобретены на рынке и торговом центре г. Астана и образцы сыворотки крови животных (кролик, крыса, мышь, собака) и человека.

Условия проведения ПЦР были оптимизированы для каждого анализа относительно отжига температурной и мультиплексной совместимости праймеров.

Метод ПЦР для агарозы, основанный на геле детекции, был выполнен в 25 мкл, используя 1-10 нг образца ДНК (или ткани), 1x Phusion ПЦР буфер (Thermo Fisher Scientific), 0.2 mM dNTPs, 0.1 μ M каждого олигонуклеотидного праймера (5 наборов праймеров), и 0.2 μ l Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ L).

Начальная денатурация 300 с в 95°C, последующие 30 циклов: денатурация при 95°C в течение 20 с и 30 с отжига при 65°C (детекции). Количественные эксперименты ПЦР были выполнены, используя ABI 7000 систему обнаружения последовательности (Applied Biosystems, Inc.)

ДНК крупного рогатого скота (*Bos taurus*), лошади (*Equus caballus*), овцы (*Ovis aries*), собаки (*Canis familiaris*), крысы (*Rattus norvegicus*), мыши (*Mus musculus*), свиньи (*Sus scrofa*) и человека (*Homo sapiens*) были получены из мышечной ткани, крови, используя кислый СТАВ буфер для экстракции (2% СТАВ, 2 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM HEPES, pH 5.3 with 200 μ g of proteinase K) по протоколу [17].

Образцы инкубированы в течение 2-3 часов при 55°C. Водная фаза экстрагировалась с помощью хлороформа и ДНК осаждалась равным объемом изопропилового спирта. Осадок ДНК растворяли в 1xTE, pH 8.0 (с РНК-азой А) в 55°C.

Поиск нуклеотидной последовательности для различных интересующих геномов проводили по генетической базе Института исследований генетической информации (Genetic Information Research Institute (GIRI) (<http://www.girinst.org/>), “Browse Rebase” [18].

Для каждого семейства SINE были получены последовательности, которые были множественно выровнены с помощью инструментов EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) [19].

Консервативные участки ретротранспозонов использовались для дизайна ПЦР праймеров с помощью программы FastPCR (<http://primerdigital.com/fastper.html>) [20].

Детекцию фрагментов амплификации проводили с помощью метода электрофореза в агарозном геле. По окончании электрофореза гель помещали на фильтр трансиллюминатора системы для документирования гелей и проводили учет полученных результатов в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм. Регистрацию и документирование полученных результатов путем занесения в базу данных компьютера осуществляли при помощи системы для документирования гелей в соответствии с прилагаемым к ней техническим описанием.

Результаты исследований и их обсуждение

Подбор праймеров осуществлялся с использованием программного обеспечения FastPCR, посредством которой, был проведен анализ выбранных консервативных участков ретротранспозонов для дизайна праймеров наиболее оптимальные для целей идентификации и определения и подтверждения подлинности конкретного вида животного в мясных продуктах.

Для ПЦР амплификации были разработаны праймеры, которые комплементарны консервативной последовательности ретротраспозона для конкретного исследуемого вида табл. 1.

Таблица 1 – Полученные участки повторяющихся элементов SINE и их присоединение

Общее название	Порядок	Семейство	Род и вид	Повторяющийся элемент	Присоединение
Человек	Primates	Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	SINE1/7SL	AluJ-, AluS-
КРС	Artiodactyla	Bovidae	<i>Bos taurus</i>	BOVA2	AF327250
Овца	Artiodactyla	Bovidae	<i>Ovis aries</i>	BOVA2	AF327250
Свинья	Artiodactyla	Suidae	<i>Sus scrofa</i>	SINE2/tRNA	PRE1 SS
Лошадь	Perissodactyla	Equidae	<i>Equus caballus</i>	SINE2/tRNA	SINE2-1_EC
Собака	Carnivora	Canidae	<i>Canis familiaris</i>	SINE2/tRNA	SINEC1A_CF
Мышь	Rodentia	Muridae	<i>Mus musculus</i>	SINE2/tRNA	Rat_B2_Rat1
Крыса	Rodentia	Muridae	<i>Rattus norvegicus</i>	SINE2/tRNA	Rat_B2_Rat1

В таблице 2 представлен разработанный дизайн пар ПЦР праймеров для детекции ДНК человека и разных видов животных в пищевых продуктах.

Таблица 2 – Дизайн пар ПЦР праймеров для для детекции ДНК человека и разных видов животных в пищевых продуктах

Консервативная последовательность (5'-3')	Комбинации праймеров	Предназначение	Длина ПЦР продукта (п.н)
5'-GTGGCTCACGCCTGTAATCCCA - 3' 5'-CAGGCTGGAGTGCAGTGG - 3'	5118 5120	Определение генома человека	245
5'-GAGAAGGCAATGGCACCCCA - 3' 5'-CCCTGGGATTCTCCAG GCAAG - 3'	5114 5117	Определение генома КРС/ овцы	195
5'-TCCCTGCCCTTGCTCAGTGGGT - 3' 5'-ATATGGAGGTTCCCAGGCTAGG - 3'	5112 5113	Определение генома свиньи	151
5'-GGCTGGAGAGATGGCTCAG - 3' 5'-CAGACACACCAGAAGAGGGCATC - 3'	5109 5110	Определение генома мыши/крысы	131
5'-GATSCCTGGGTGGCKCAG - 3' 5'-TCGATCCCGGTCTCCAGGAT - 3'	5100 5101	Определение генома собаки	71
5'-CTGTGATGCTGAAAGCTATGCCAC - 3' 5'-TGGCCAGGTCCCTTCTTCCSTAG - 3'	5188 5190	Определение генома конины	115

Выбранные праймеры были тестированы для идентификации специфичной ДНК соответствующих видов животных в определении и подтверждении подлинности конкретного вида животного в мясных продуктах (сосисках, колбасах, фарше и т.д.) рис. 1.

<p>20160518_1 Тестирование праймером: ДНК разных животных и человека Комбинации праймеров: 1. 5114-5117 (Корова, овца) 2. 5112-5113 (Свинья) 3. 5109-5110 (Крыса) 4. 5118-5120 (Человек)</p>	<p>DNA 1. Корова 2. Лошадь 3. Овца 4. Свинья 5. Человек 6. Кролик 7. Мышь 8. Курица 9. Фарш говяжий (состав: говядина) 10. Сосиски 1 (состав: говядина, курица) 11. Сосиски 2 (состав: говядина) 12. Колбаса высший сорт (состав: говядина, свинина)</p>
---	--

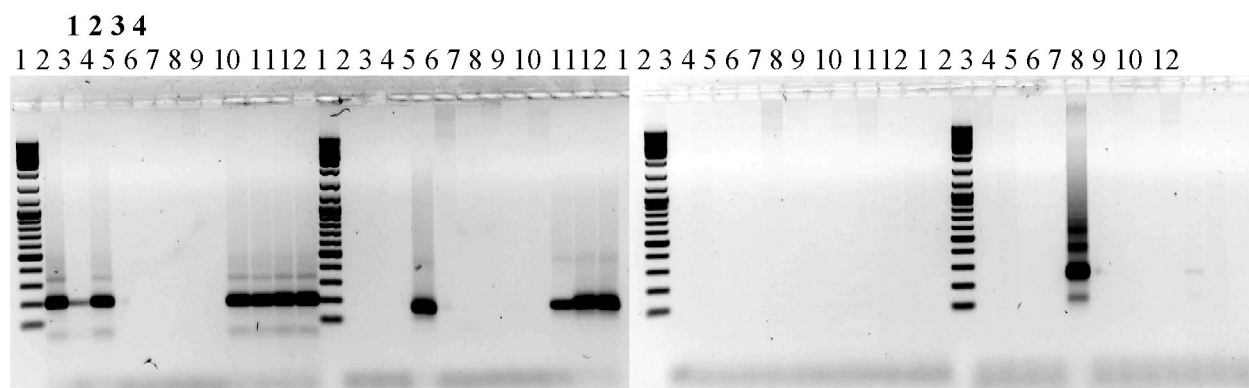


Рисунок 1 - ПЦР анализ, тестирование праймером ДНК образцов животного происхождения и продуктов питания. ДНК маркеры (GeneRuler™ DNA Ladder Mix)

Комбинация праймеров: 1. 5114-5117 (КРС, овца) показала присутствие видоспецифичной ДНК КРС и овцы в следующих мясных продуктах: фарш (состав: говядина); сосиски 1 (состав: говядина, курица); сосиски 2 (состав: говядина); колбаса (состав: говядина, свинина).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в перечисленных мясных продуктах содержится ДНК КРС и овцы, что соответствует информации на этикетке данных продуктов.

Комбинация праймеров: 2. 5112-5113 (Свинья) так же показала присутствие видоспецифичной ДНК свиньи в следующих мясных продуктах: сосиски 1 (состав: говядина, курица); сосиски 2 (состав: говядина); колбаса (состав: говядина, свинина)

Полученные данные свидетельствуют о том, что в перечисленных мясных продуктах содержится ДНК свиньи, что не соответствует информации на этикетке данных продуктов, исключением является колбаса, в составе которой указано содержание свинины.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о фальсификации мясных продуктов, информация на этикетке которых не соответствует качественным показателям товара.

Комбинация праймеров: 3. 5109-5110 (Крыса) и 4. 5118-5120 (Человек) – показала отсутствие видоспецифичной ДНК крысы и человека в мясных продуктах.

Таким образом, используя классический ПЦР на основе последовательностей ретро-транспозонов с применением Inter-SINE –ПЦР, были сконструированы и подобраны праймеры для видовой идентификации видоспецифичной ДНК крупного рогатого скота (овцы), лошади, собаки, крысы (мыши), свиньи и человека. Использовались следующие комбинации праймеров табл.3

Таким образом, разработанный метод, используемый в наших исследованиях, основан на выявлении фрагментов видоспецифичной ДНК, присутствие которых в анализируемом материале однозначно свидетельствует о наличии в нем, компонентов тканей животных определённого вида.

Таблица 3 – Сконструированные праймеры для видовой идентификации видоспецифичной ДНК крупного рогатого скота/овцы, свиньи, мыши/крысы, и человека

Комбинации праймеров	Предназначение	Длина ПЦР продукта (п.н.)
A 5114-5117	Определение генома КРС/овцы	195
B 5112-5113	Определение генома свиньи	151
C 5109-5110	Определение генома мыши/крысы	131
D 5118-5120	Определение генома человека	245

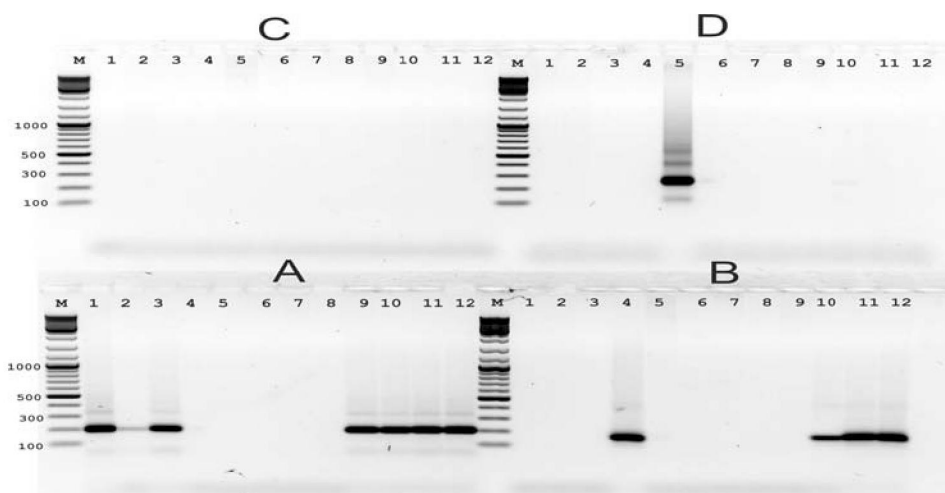


Рисунок 1 - ПЦР анализ ДНК образцов животного происхождения и продуктов питания. 1- корова; 2- лошадь; 3- овца; 4- свинья; 5- человек; 6- кролик; 7- мышь; 8- курица; 9- фарш говяжий; 10- сосиска 1 (высший сорт); 11- сосиска 2 (высший сорт); 12- колбаса говядина-свинина (высший сорт). М - ДНК маркеры (GeneRuler™ DNA Ladder Mix)

Данный метод применяется для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК крупного рогатого скота (*Bos taurus*), свиньи (*Sus scrofa*), овцы (*Ovis aries*), лошади (*Equus caballus*), а также курицы (*Gallus gallus*), человека (*Homo sapiens*), собаки (*Canis lupus*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*), мыши (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus rattus*).

Разработанная технология предназначена для ускоренной генетической идентификации видоспецифической ДНК соответствующих видов животных с высокой чувствительностью для любого типа мясного продукта (смешанных или однородных), в сыром или конечном, готовом к употреблению виде при минимальных затратах и малозатратном оборудовании.

Используя классический ПЦР с применением TaqMan SINE-ПЦР, у крупного рогатого скота/овцы был линейный диапазон длины специфических фрагментов, являющихся продуктами амплификации (195 п.н.), у свиньи (151 п.н.), у мыши/крысы (131 п.н.), человека (245 п.н.).

Таким образом, гибридно-видовая амплификация ограничивает эффективный диапазон каждого вида intra-SINE ПЦР к 0.01 пг (0.0001% в 10 нг образец), когда эквивалентные количества ДНК других видов могут присутствовать в образцах, что ограничивает эффективный диапазон Intra-SINE-ПЦР анализа, приблизительно к 0.01 пг, тестируя образцы ДНК, состоявшие из множественных видов млекопитающих. Таким образом, чувствительность метода составила 0,01%

Результаты исследований легли в основу разработанных методических рекомендаций «Ускоренная идентификация специфичной ДНК разных видов животных в пищевых продуктах».

Выводы

1. На основании компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей семейства SINE определены консервативные участки нуклеотидных последовательностей повторяющихся элементов SINE и их присоединение у сельскохозяйственных животных и птицы.

2. Сконструированы оригинальные видоспецифические праймеры для каждого из повторных элементов, чтобы сравнить эффективность и воспроизводимость амплификации.

3. Выбранные праймеры соответствуют мотивам, в достаточной мере сохраненным в ретротранспозонах, чтобы позволить амплификацию почти всех целей в геноме.

4. Разработан метод, позволяющий идентифицировать ДНК следующих биологических объектов: ДНК крупного рогатого скота (*Bos taurus*), свиньи (*Sus scrofa*), овцы (*Ovis aries*), лошади (*Equus caballus*), а также курицы (*Gallus gallus*), человека (*Homo sapiens*), собаки (*Canis lupus*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*), мыши (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus rattus*).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Коваленок А.В., Соммер Н.В., Курочкин А.Ю. Мероприятия по предупреждению доступа фальсифицированных товаров для сетевых предприятий торговли//Все о мясе - 2015 -№2 –С.35-39
- [2] Закон Республики Казахстан от 10 июля 2002 года № 339-III «О ветеринарии»
- [3] Закон Республики Казахстан от 4 мая 2010 года № 274-IV «О защите прав потребителей»
- [4] Закон Республики Казахстан от 9 ноября 2004 года № 603-III «О техническом регулировании» (с изменениями и дополнениями по состоянию на 07.04.2016 г.)
- [5] Окара А.И. О возможности и целесообразности использования полимеразной цепной реакции//Мясная индустрия- 2004 - №9 -С.28-29.
- [6] Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений//Монография. – Одесса, 2011. – С.4 -335.
- [7] Kumar, A., Kumar, R., Sharma, B., Gokulakrishnan, P., Mendiratta, S., & Sharma, D. (2013). Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1340-1351
- [8] Singh, V., & Neelam, S. (2011). Meat species specifications to ensure the quality of meat: a review. *International Journal of Meat Science*, 1, 15-26.
- [9] Kalendar R, Lee D, Schulman AH FASTPCR software for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Methods in Molecular Biology*, – 2014, 1116: 271-302. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_18
- [10] Kalendar R, Schulman AH Transposon based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. *Methods in Molecular Biology series: Molecular Plant Taxonomy. Protocols and applications*, ed. Besse P., – 2014, 1115: 233-255. ISBN 978-1-62703-766-2. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_12
- [11] Kalendar R, Flavell A, Ellis THN, Sjakste T, Moisy C, Schulman AH Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*. – 2011, 106: 520–530. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2010.93>
- [12] Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius-Klemola K, Sela H, Peleg O, Schulman AH Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008, 105(15): 5833-5838. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709698105>
- [13] Kalendar R, Schulman AH IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*. – 2006, 1(5): 2478-2484. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.377>
- [14] Kalendar R, Vicent CM, Peleg O, Ananthawat-Jonsson K, Bolshoy A, Schulman AH Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. *Genetics*. – 2004, 166(3): 1437-1450. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.166.3.1437>
- [15] Baumel A, Ainouch M, Kalendar R, Schulman AH Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* Hubard (Poaceae). *Molecular Biology and Evolution*. – 2002, 19 (8): 1218-1227.
- [16] Vicent C M, Kalendar R, Schulman AH Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Research*. – 2001, 11: 2041-2049. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.193301>
- [17] Proteinase K method for DNA extraction protocol [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://primerdigital.com/dna.html>
- [18] Genetic Information Research Institute (GIRI) [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://www.girinst.org/>
- [19] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Multiple Sequence Alignment (MSA) [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>
- [20] FastPCR is an integrated tool for PCR primers or probe design, *in silico* PCR, oligonucleotide assembly and analyses, alignment and repeat searching. [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://primerdigital.com/fastpcr.html>
- [21] Eurofins Genomics. [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://www.mwg-biotech.com>

М.Т. Нұрғалиева, Р.Н. Календарь, А.Қ. Смағұлов, Ж.А. Исакова

Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы қаласы, ҚР
РМК Ұлттық биотехнология орталығы ШҚ ҚР БҒМ, ҚР

РЕТРОТРАНСПОЗОН ТІЗБЕКТЕР НЕГІЗІНДЕ ЕТ ШИКВАТЫН ЖӘНЕ ЕТ ӨНІМДЕРІН СӘЙКЕСТЕНДІРУ ҮШІН ПРАЙМЕРЛЕРДЫ ТЕСТІЛЕУ

Аннотация. Бұл зерттеуде Inter SINE ПЦР әдісін қолдана отырып ретротранспозондардың комплементарды шекті учаскелеріне праймерлердің комбинациясының тестілеу туралы қарастырылады.

Тірек сөздер: түрлері жалған, түрлі шығарылған еттің сәйкестендіру, ДНК, Inter SINE ПЦР әдісі, ретро-транспозонның консервативті учаскелері, праймерлер, нуклеотидтық жүйелілігі, геном.