

УДК 637.12.04/.07

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-12-15>

Краткий обзор/Brief review

Жижин Н.А.

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35

E-mail: zhizhinmoloko@mail.ru

Ключевые слова: ПЦР, идентификация, овечье молоко, козье молоко

Для цитирования: Жижин Н.А. Применение метода ПЦР для обнаружения фальсификации овечьего молока козьим молоком. *Аграрная наука.* 2021; 350 (6): 12–15.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-12-15>

Конфликт интересов отсутствует

Nikolay A. Zhizhin

All-Russian Research Institute of the Dairy Industry; 35, Lyusinovskaya str., Moscow, 115093, Russia

Email: zhizhinmoloko@mail.ru

Key words: PCR, identification, sheep milk, goat milk

For citation: Zhizhin N.A. Application of the PCR method to detect the falsification of sheep milk with goat milk. *Agrarian Science.* 2021; 350 (6): 12–15. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-12-15>

There is no conflict of interests

Применение метода ПЦР для обнаружения фальсификации овечьего молока козьим молоком

РЕЗЮМЕ

В статье рассмотрен вариант применения ПЦР-анализа для оценки чистоты видового состава овечьего молока прошедшего термическую обработку. В ходе проведения работы был изучен генетический материал основных молочных пород коз и овец, представленных на территории России. Для этого в качестве целевого гена был использован 12S rPHK козы и овцы, на основании которого была получена пара праймеров 12SCH-DIR (5'-AAACGTGTTAAAGCACTACATC-3') и 12SCH-INV (5'-GTCTTAGCTATAGTGTATCAGCTG CA-3') для козы и 12SM-FW (5'-CTAGAG-GAGCCTGTTCTATAATCGATAA-3') и 12SOA-INV (5'-GTCTCCTCTCGTGTGGTTGAGATA-3') для овцы. Полученные праймеры были протестированы на специфичность путем анализа молока различных пород коз (зааненская, тоггенбургская, альпийская и нубийская молочная порода) и овец (цигайская, ассаф и восточно – фризская). В результате исследования бинарных смесей молока овцы и козы было установлено, что применение данной методики ПЦР-анализа позволяет выявлять примеси козьего молока в овечьем на уровне 0,1%. Также показано, что методика применима как к сырому молоку, так и к молоку прошедшему технологическую обработку.

Application of the PCR method to detect the falsification of sheep milk with goat milk

ABSTRACT

The article discusses the option of using PCR analysis to assess the purity of the species composition of heat-treated sheep's milk. In the course of the work, the genetic material of the main dairy breeds of goats and sheep represented on the territory of Russia was studied. For this purpose, the 12S rRNA of a goat and a sheep was used as a target gene, on the basis of which a pair of primers 12SCH-DIR (5'-AAACGTGTTAAAGCACTACATC-3') and 12SCH-INV (5'-GTCTTAGCTATAGTGTATCAGCTG CA-3') for goat and 12SM-FW (5'-CTAGAG-GAGCCTGTTCTATAATCGATAA-3') and 12SOA-INV (5'-GTCTCCTCTCGTGTGGTTGAGATA-3') for sheep. The resulting primers were tested for specificity by analyzing the milk of various breeds of goats (Saanen, Toggenburg, Alpine and Nubian dairy) and sheep (Tsigai, Assaf and East Friesian). As a result of the study of binary mixtures of sheep and goat milk, it was found that the use of this method of PCR analysis makes it possible to detect impurities of goat's milk in sheep's milk at a level of 0.1%. It has also been shown that the technique is applicable to both raw milk and processed milk.

Поступила: 10 июня
После доработки: 15 июня
Принята к публикации: 18 июня

Received: 10 June
Revised: 15 June
Accepted: 18 June

Введение

Идентификация видового состава молочной продукции имеет огромное значение для отслеживания чистоты продукта и борьбы с возможной фальсификацией [1]. Особенно это важно когда необходимо подтвердить «видовую чистоту» произведенной молочной продукции [2].

Например, к таким продуктам можно отнести сыры, выработанные из овечьего или козьего молока. В сырах, выработанных из овечьего молока, встречаются примеси козьего молока, как более дешевого и доступного компонента. В связи с этим, развитие методов контроля оценки подлинности, заявленного производителем видового состава молочной продукции, является необходимым для исключения фальсификации «чистых» продуктов переработки молочного сырья.

Для определения видового состава молочной продукции были разработаны многочисленные аналитические методы, к которым относятся иммунологические, электрофоретические и хроматографические методы [3].

Среди иммунологических методов наиболее широкое распространение получил метод ELISA [4], поскольку этот метод прост в использовании и легко поддается автоматизации. В качестве электрофоретических методов для аутентификации молочного сырья используется капиллярный электрофорез [5], двумерный электрофорез [6] и изоэлектрическое электрофокусирование казеинов молока [7]. Для оценки белкового состава молока с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) используются два подхода: обращенная фазовая хроматография на колонках с широкими порами (300Å) и метод гелевой фильтрационной хроматографии.

Хотя перечисленные методы достаточно эффективны и широко используются, они часто не подходят для продуктов со сложными матрицами и менее чувствительны при анализе пищевой продукции прошедшей термическую обработку.

В последнее время, в методах идентификации видового состава пищевой продукции, использование ДНК заменяет белковую составляющую [8]. Это связано с тем, что молекула ДНК имеет более высокую стабильность при высоких температурах и ее структура сохраняется во всех клетках анализируемого объекта [9].

Присутствие видоспецифичных последовательностей ДНК привело к появлению анализов по идентификации пищевой продукции, основанных на ДНК-гибридизационных пробах [10]. Среди которых полимеразная цепная реакция (ПЦР) является наиболее широко используемым методом для определения происхождения видового состава продуктов питания. Одним из преимуществ методов на основе ПЦР, относительно других методов, является сочетание высокой специфичности и возможности проводить аналитические мероприятия с образцами молочной продукции прошедшей технологическую обработку.

В данной статье описывается разработка метода на основе ПЦР для обнаружения козьего молока в овечьем молоке с использованием в качестве целевого гена — 12S rРНК. Предлагаемая методика основана на очистке клеточной ДНК из молока с последующей амплификацией митохондриальной ДНК с праймерами специфичными для коз и визуализацией ампликонов на агарозном геле.

Также, для определения возможности использования предлагаемой методики для молочной продукции

прошедшей технологическую переработку, были протестированы образцы овечьего и козьего молока прошедшего термическую обработку.

Материалы и методы

В качестве аналитов были использованы образцы сборного молока козы и овцы, из которых были приготовлены бинарные смеси в различных процентных соотношениях 0,1, 0,5, 1, 5, 10 и 100% (v/v). При анализе были использованы смеси сырого, пастеризованного (65 °C, 30 мин) и стерилизованного (121 °C, 20 мин) молока.

Процедуру экстракции ДНК проводили по следующей схеме: к 1 см³ образца молока добавляли 0,5 см³ раствора для экстракции (0,15M N-[2-ацетамидо]-2-аминодиуксусная кислота). Далее полученную смесь тщательно перемешивали при помощи вортекса. После перемешивания анализируемую смесь подвергали процедуре центрифугирования при 15000 g/5 мин. После центрифугирования супернатант был удален при помощи пипетки Пастера, а к осадку добавлялся 850 мкл буфера для экстракции (pH 8,0; 10 mM Трис, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA и 1% SDS, 100 мкл 5 M гуанидина гидрохлорид и 40 мкл 20 мг / мл протеиназы К). После чего анализируемые образцы инкубировали в течение 12 часов при температуре 55 °C. К полученному после инкубирования лизату приливали 500 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут. Полученную ДНК элюировали 100 мкл стерильной деионизированной воды, а его концентрацию определяли спектрофотометрически при 260 нм.

Данные полученные после выравнивания последовательностей гена 12S rРНК козы и овцы были использованы для создания следующей пары праймеров: 12SCH-DIR (5'-AAACGTGTTAAAGCACTACATC-3') и 12SCH-INV (5'-GTCTTAGCTATAGTGATCAGCTG CA-3') для козы и 12SM-FW (5'-CTAGAG-GAGCCTGTTCTATAATCGATAA-3') и 12SOA-INV (5'-GTCTCCTCTCGTGTGGTTGAGATA-3') для овцы.

Специфичность праймеров была подтверждена тестированием различных образцов молока различных пород коз (зааненская, тоггенбургская, альпийская и нубийская молочная порода) и овец (цигайская, ассаф и восточно — фризская).

После оценки пригодности праймеров, бинарные смеси сырого и подвергнутого термической обработке молока овец, содержащего различные количества козьего молока, были протестированы на амплификацию ДНК с использованием праймеров специфичных для коз.

Амплификацию проводили в объеме 50 мкл. Содержащем 100 нг матричной ДНК, 2 ммоль MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера, 200 мкмоль каждого dNTP и 2 ед. ДНК-полимеразы Tth. Амплификация проводилась по следующей схеме: денатурация цепи при 93 °C в течение 30 с, отжиг праймера при 63 °C в течение 30 с и удлинение праймера при 72 °C в течение 45 с. Предел обнаружения метода оценивали электрофорезом в агарозном геле продуктов ПЦР, полученных из каждой бинарной смеси молока.

Результаты и обсуждение

ДНК выделенная из козьего молока была успешно амплифицирована с парой праймеров 12SCH-DIR — 12SCH-INV, давая ожидаемый фрагмент ПЦР 122bp, тогда как продукты амплификации ДНК овцы данного фрагмента не имеют (рис. 1).

Рис. 1. Электрофоретический анализ амплификации специфической козьей 12S рРНК: СММ — стандарт молекулярных масс; 1 — коза; 2 — овца (сырое молоко); 3 — овца (пастеризованное молоко 65 °С, 30 мин); 4 — овца (стерилизованное 121 °С, 20 мин)

Fig. 1. Electrophoretic analysis of amplification of specific goat 12S rRNA: SMM — standard of molecular weights; 1 — goat; 2 — sheep (raw milk); 3 — sheep (pasteurized milk 65 °C, 30 min); 4 — sheep (sterilized at 121 °C, 20 min)

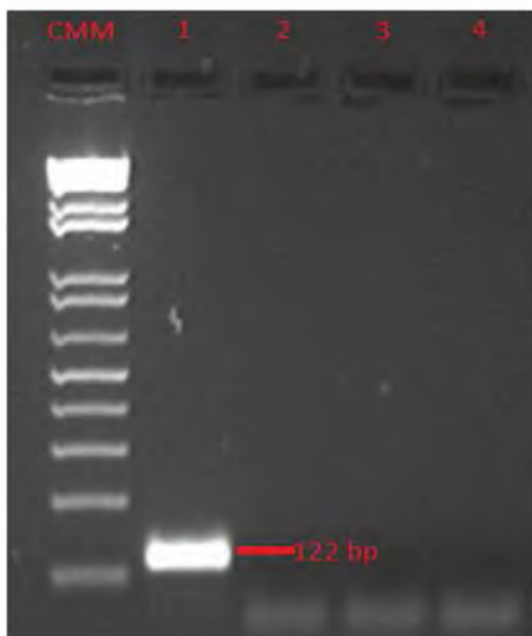


Рис. 2. Электрофоретический анализ амплификации специфической 12S рРНК овцы: СММ — стандарт молекулярных масс; 1 — коза; 2 — овца (сырое молоко); 3 — овца (пастеризованное молоко 65 °С, 30 мин); 4 — овца (стерилизованное 121 °С, 20 мин)

Fig. 2. Electrophoretic analysis of amplification of specific sheep 12S rRNA: SMM — standard of molecular weights; 1 — goat; 2 — sheep (raw milk); 3 — sheep (pasteurized milk 65 °C, 30 min); 4 — sheep (sterilized at 121 °C, 20 min)

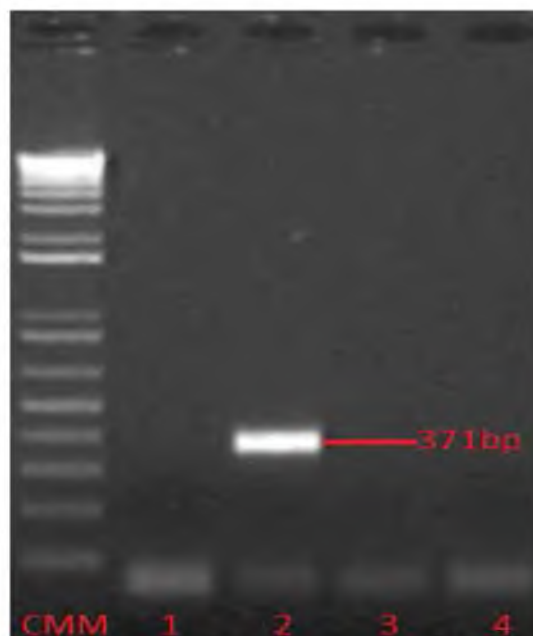


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР 12S рРНК, полученных из бинарных смесей сырого молока козы и овцы, с использованием праймеров 12SCH-DIR и 12SCH-INV: СММ — стандарт молекулярных масс; 1 — коза 100%; 2 — коза 10%; 3 — коза 5%; 4 — коза 1%; 5 — коза 0,5; 6 — коза 0,1%; 7 — овца 100%

Fig. 3. Electrophoretic analysis of 12S rRNA PCR products obtained from binary mixtures of raw goat and sheep milk using primers 12SCH-DIR and 12SCH-INV: SMM — standard of molecular weights; 1 — goat 100%; 2 — goat 10%; 3 — goat 5%; 4 — goat 1%; 5 — goat 0.5; 6 — goat 0.1%; 7 — sheep 100%

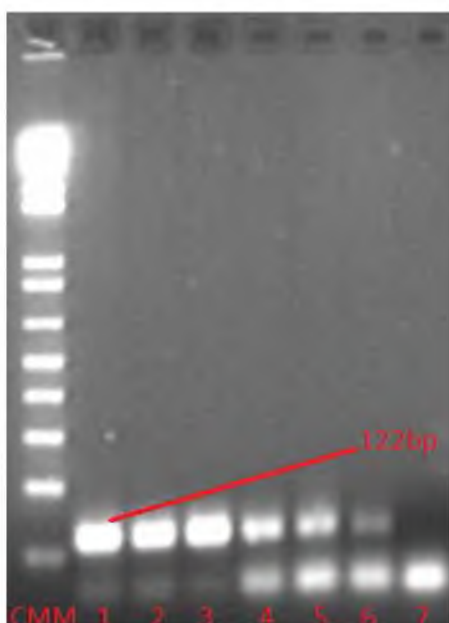
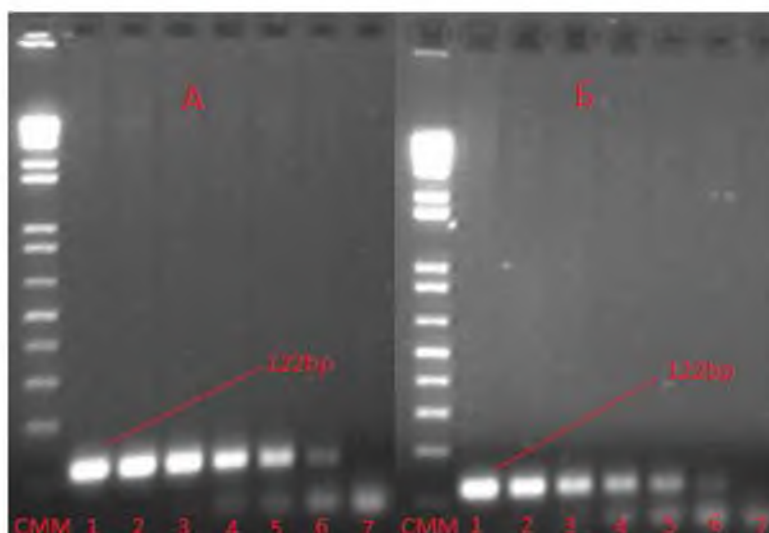


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР 12S рРНК, полученных из бинарных смесей термообработанного молока козы и овцы, с использованием праймеров 12SCH-DIR и 12SCH-INV: А — пастеризованные образцы (65 °С, 30 мин); Б — стерилизованные образцы (120 °С, 20 мин); СММ — стандарт молекулярных масс; 1 — коза 100%; 2 — коза 10%; 3 — коза 5%; 4 — коза 1%; 5 — коза 0,5; 6 — коза 0,1%; 7 — овца 100%

Fig. 4. Electrophoretic analysis of 12S rRNA PCR products obtained from binary mixtures of heat-treated goat and sheep milk using primers 12SCH-DIR and 12SCH-INV: А — pasteurized samples (65 °C, 30 min); Б — sterilized samples (120 °C, 20 min); SMM — standard of molecular weights; 1 — goat 100%; 2 — goat 10%; 3 — goat 5%; 4 — goat 1%; 5 — goat 0.5; 6 — goat 0.1%; 7 — sheep 100%



Для подтверждения работоспособности методики также был проведен анализ молока с помощью набора праймеров для овец 12SM-FW — 12SOA-INV (рис. 2).

ДНК овцы была успешно амплифицирована с этой парой праймеров, давая ожидаемый ПЦР — фрагмент длиной 371bp., тогда как для тестируемых образцов козьего молока данный фрагмент обнаружен не был.

Для определения предела обнаружения ПЦР сначала проводили реакции амплификации ДНК, выделенной из бинарных смесей сырого молока (козье и овечье), содержащих 0,1, 0,5, 1, 5, 10 и 100% (v/v) козьего молока. На рисунке 3 показан специфический для козы ПЦР-фрагмент длиной 122bp, полученный из смесей козьего и овечьего молока, а также взаимосвязь между количествами матричной ДНК и интенсивностью полосы. Порог обнаружения составил 0,1%.

Для оценки влияния термообработки на результат ПЦР-анализа, бинарные смеси молока козы и овцы также подвергались технологическим режимам обработки в виде пастеризации (65 °C, 30 мин) и стерилизации (121 °C, 20 мин). На основе полученных экспериментальных образцов были получены модели амплификации и пределы обнаружения, аналогичные тем, которые были получены для образцов сырого мо-

лока. Результаты в виде электрофореграм представлены на рис. 4.

Выводы

Несмотря на то, что ДНК, как и белок, претерпевает денатурацию при температурной обработке, возможно использование коротких фрагментов для проведения процесса амплификации, что позволяет получать фрагменты ДНК длиной и чистотой достаточной для проведения анализа.

В этой работе было изучено влияние термической обработки молока на возможности метода ПЦР-анализа как инструмента по выявлению видовой принадлежности молочного сырья. Результаты, полученные в ходе исследования экспериментальных смесей овечьего и козьего молока прошедшего термическую обработку, показали, что картина электрофоретического разделения и нижний предел обнаружения, не имеют существенного изменения по сравнению с анализируемым сырым молоком.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что метод ПЦР описанный в данной статье является специфическим и обеспечивает возможность выявления замены примесей козьего молока на уровне 0,1%.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Юрова, Е.А. Разработка современных методов анализа для идентификации молока и молочной продукции // Молочная река. 2019. № 2 (74)/ С. 22-25.
2. Zachar P.M., Šoltés R., Kasarda J., Novotný M., Novíkmecová, and D. Marcincáková. 2011. Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo* 61: 199–207.
3. Mayer H.K. 2005. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *Int. Dairy J.* 15:595–604.
4. Ritcher W., Krause I., Graf C., Sperrer I., Schwarza C., Klostermeyer H. (1997). An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine g-caseins. *Zeitschrift f. ur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 204, 21–26.
5. Molina E., De Frutos M., Ramos M. (2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks. *Journal of DairyResearch*, 67, 209–216.
6. Chianese L., Laezza P., Smaldone L.A., Stingo C., Del Giovine L., Addeo F. (1990). Evaluation of bovine milk in the buffalo mozzarella cheese by two-dimensional electrophoresis. *Scienza eTecnica Lattiero-Casearia*, 41, 315–326.
7. Addeo F., Moio L., Chianese C., Stingo C., Resini P., Berner I., Krause I., Di Luccia A., Bocca A. (1990). Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of caseins. *Milchwissenschaft*, 45, 708–711.
8. Радаева И.А. Современные ДНК-методы в оценке технологического потенциала молочного сырья / И.А. Радаева, Р.Р. Вафин, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Пищевая промышленность. - 2020. - №5. - С.19-22.
9. Юрова Е.А. и др. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции. *Вестник МГТУ*. 2020. Т. 23, № 3.
10. Partis L., Croan D., Guo Z., Clark R., Coldham T., Murby J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science*, 54, 369–376.

REFERENCES

1. Yurova, E.A. Development of modern methods of analysis for the identification of milk and dairy products // *Molochnaya river*. 2019. - No. 2 (74) - S. 22-25.
2. Zachar P.M., Šoltés R., Kasarda J., Novotný M., Novíkmecová, and D. Marcincáková. 2011. Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo* 61: 199–207.
3. Mayer, H. K. 2005. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *Int. Dairy J.* 15: 595-604.
4. Ritcher, W., Krause, I., Graf, C., Sperrer, I., Schwarza, C., & Klostermeyer, H. (1997). An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine g-caseins. *Zeitschrift f. ur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 204, 21-26.
5. Molina, E., De Frutos, M., & Ramos, M. (2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks. *Journal of DairyResearch*, 67, 209-216.
6. Chianese, L., Laezza, P., Smaldone, L. A., Stingo, C., Del Giovine, L., & Addeo, F. (1990). Evaluation of bovine milk in the buffalo mozzarella cheese by two-dimensional electrophoresis. *Scienza eTecnica Lattiero-Casearia*, 41, 315-326.
7. Addeo, F., Moio, L., Chianese, C., Stingo, C., Resini, P., Berner, I., Krause, I., Di Luccia, A., & Bocca, A. (1990). Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of caseins. *Milchwissenschaft*, 45, 708-711.
8. Radaeva I.A. Modern DNA methods in assessing the technological potential of milk raw materials / I.A.Radaeva, R.R. Vafin, S.N. Turovskaya, E.E. Illarionova, A.V. Bigaeva // *Food Industry*. - 2020. - No. 5. - S.19-22.
9. Yurova EA et al. Application of molecular genetic methods of analysis to identify the species of the raw material composition of food products. *Bulletin of MSTU*. 2020.Vol. 23, No. 3.
10. Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., & Murby, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science*, 54, 369-376.