

К ВОПРОСУ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ФАЛЬСИФИКАЦИИ КОЗЬЕГО МОЛОКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

А.В. Хан, О.Ю. Фоменко

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия

Фальсификация молока является одной из основных глобальных проблем, поскольку из-за своей высокой пищевой ценности оно в больших количествах потребляется во всех частях мира. Разрыв между производством молока и спросом на него приводит к возникновению недобросовестной практики по фальсификации продукции [1]. Одним из методов определения подлинности молока является ПЦР. Высокая специфичность, чувствительность, быстрота и относительная простота выполнения ПЦР-анализа позволяют успешно использовать его как для контроля микробиологических показателей входного сырья и готовой продукции, так и для оценки видовой составляющей продуктов питания [2].

Использование прямой ПЦР даёт ряд дополнительных преимуществ, важнейшим из которых является увеличение количества доступной для амплификации ДНК-матрицы, потери которой в ходе традиционных процессов выделения и очистки могут достигать 83 % [3]. Образцы коровьего и козьего молока, приобретённые на локальном продовольственном рынке, использовали для приготовления модельных смесей, имитировавших различную степень фальсификации конечной продукции. Объёмная доля примеси коровьего молока варьировала от 0,1 до 99,9 %. Определение пригодности применения метода прямой ПЦР для выявления фальсификации молока проводили с использованием набора реагентов «2,5X Mas HFBL MIX-3510» (ЗАО «Диалат Лтд», Россия). В качестве источника ДНК в реакционную смесь общим объёмом 25 мкл вносили по 2 мкл модельных смесей молока. Амплификацию фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы I *B. taurus* осуществляли с использованием пары праймеров Bos-F6 (5'-CATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAG-3') и Uni-R (5'-CCGAATGGTTCYTTTTTCCYAGTAGTA-3'), ранее использованные для идентификации видовой принадлежности мясной продукции [4]. Программа амплификации состояла из начальной денатурации при 98 °C в течение 5 мин, 35 циклов вида 98 °C – 10 сек, 64 °C – 30 сек, 72 °C – 20 сек, и финальной элонгации при 72 °C в течение 10 минут.

В ходе выполнения работы было установлено, что применение метода прямой ПЦР позволяет успешно амплифицировать фрагмент митохондриальной ДНК *B. taurus* размером в 311 пар оснований. Использование неочищенных биологических образцов (молока) в объёме 8 % от реакционной смеси, не вызывало ингибирования полимеразной цепной реакции. Получение в результате протекания ПЦР ампликона с длиной 311 пар оснований позволяет с уверенностью судить о наличии примеси коровьего молока в анализируемом образце. Учёт результатов ПЦР путём электрофореза в 2 % агарозном геле показал, что нижняя граница обнаружения подмеса коровьего молока составляет 0,1 % от объёма смеси (рис. 1).

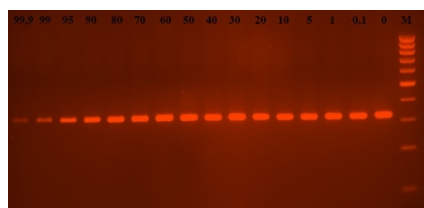


Рис. 1. Результаты прямой ПЦР для определения подлинности сырого козьего молока (99,9–0 – объёмная доля козьего молока в смеси, %; М – маркер длин ДНК «100+ bp DNA Ladder»)

Таким образом, прямая ПЦР с амплификацией видоспецифических фрагментов митохондриальной ДНК представляет собой перспективный метод выявления фальсификации козьего молока молоком крупного рогатого скота, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью.

Литература

1. R. Nagraik, A. Sharma, D. Kumar, P. Chawla, A.P. Kumar. Milk adulterant detection: Conventional and biosensor based approaches: A review // Sensing and Bio-Sensing Research. – 2021. – Vol. 33. – 100433. DOI: 10.1016/j.sbsr.2021.100433.
2. Е.А. Юрова, Н.А. Жижин, С.А. Фильчакова. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции // Вестник МГТУ. – 2020. – Т. 23, № 3. – С. 214–223. DOI: 10.21443/1560-9278-2020-23-3-214-223.
3. Martin B, Linacre A. Direct PCR: A review of use and limitations // Sci Justice. – 2020. – Vol. 60(4). – P. 303–310. DOI: 10.1016/j.scijus.2020.04.003.
4. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products // Food Chem. – 2014. – V. 163. – P. 77–82. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.062.