

**Г.К. Абитаева^{1*}, А.К. Шагирова¹, М.Р. Төлеубекова¹, Н.А. Куцева¹,
А.Б. Абеев², З.С. Сармурзина¹**

¹ҚР БҒМ ҒК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» РМК, Астана, Қазақстан

²«ABIOTECH» ЖШС, Астана, Қазақстан

*Байланыс үшін автор: gulyaim_as@mail.ru

«Нақты уақыт» режиміндегі полимеразды тізбекті реакция әдісімен тамақ өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау бойынша хаттама әзірлеу

Аңдатпа. Ет өнімдерінің фальсификациясы бүкіл әлемде маңызды проблемаға айналууда, оның ішінде сәйкес келмейтін таңбалау, тыйым салынған қоспалар немесе құрамына кіретін қымбат қоспаларды арзан қоспалармен алмастыру. Мұндай манипуляциялардың салдары тұтынушы денсаулығына әртүрлі қауіпті болуы мүмкін, мысалы, тамақ аллергиясы, улану. Мақалада шикі және термиялық өңделген ет өнімдерінде нақты уақыт режимінде полимеразды тізбекті реакция әдісімен тауықтың митохондриялық геномының (*Gallus gallus*) ДНК-сын сапалы анықтауға арналған хаттама жасалды.

Зерттеу әдістері. Мақала тауық, күрке тауық, жылқы, қой, шошқа және сиыр етінен ет пен ет өнімдерінің қоспаларын анықтау үшін жүргізілді. Фальсификацияны зерттеу үшін еттің 9 түрінен және өсімдіктің екі түрінен алынған 11 үлгі дайындалды. PrepMap Ultra ДНК оқшаулау жиынтығының (Thermo Fisher, АҚШ) көмегімен 1 900 нг/мкл және 140 нг/мкл аралығында жоғары концентрациясы бар ДНК алынды. Арнайы праймерлер мен флуоресцентті зондтарды таңдау GenBank-тен алынған *Gallus gallus* генінің реттілігін теңестіру негізінде жүргізілді. Барлық тізбектер Primer Designer 3.0 бағдарламалық жасақтамасының көмегімен тураланған және ThermoFisher-де синтезделген.

Нәтижелер. Зерттеу барысында нақты уақыт режимінде полимеразды тізбекті реакция әдісімен тамақ өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау бойынша хаттама әзірленді. ПТР хаттамасының арнайылығын анықтау үшін ДНК үлгілерінің коллекциясына сыналып және сезімталдықты анықтау үшін әртүрлі ДНК мазмұны бар ПТР қойылды. Тауықтың ДНК-сы ДНК матрицасында 0,01–10% аралығында айқын байқалды.

Қорытынды. Зерттеулер көрсеткендей, әзірленген хаттама нақты уақыт режимінде полимеразды тізбекті реакция әдісімен тауықтың ДНК-сын анықтаудың жоғары сезімтал және нақты экспресс әдісі болып табылады, бұл оларды жануарлардың ДНК-сын анықтау диагностикасында қолдануға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: ДНК, ет өнімдері, ПТР, нақты уақытындағы ПТР, ДНК-ны оқшаулау, фальсификация, сезімталдық.

DOI: 10.32523/2616-7034-2022-140-3-60-75

Кіріспе

Ет өнімдерінің түрлік фальсификациясы ерекше орын алады және жиі фальсификацияланатын өнімдер санатына кіреді [1]. Бұған әлемнің түрлі елдерінде ет өнімдерінің түрлік фальсификация жағдайларын анықтау нәтижелілігінің жоғары үлес салмағы дәлел болып табылады [2, 3]. Мысалға, 2020 жылы Оңтүстік Африка супермаркеттерінде тұтынушыларға қол жетімді болған 44 дана дайын ет өнімдерін тексеру нәтижесінде, 27%-ы құрамында мәлімделмеген жануарлардың еттері бар екені анықталған [4]. Сондай-ақ, 2020 жылы Дерц және басқалар жүргізген зерттеуде өнімнің едәуір бөлігінде мәлімделген ет жоқ екендігі анықталды (қатты шикі шұжықтар үшін 55% немесе 11/20, ветчина үшін 33% немесе 1/3) [5]. Сонымен қатар

2020 жылы Грецияда тағам құрамында ГМО-ны үлесін зерттеу кезінде, сатылымда болған ет өнімдерінде белгіленбеген ГМО үлесі 72 өнімде табылды. Яғни үлгілердің 52% - ы дұрыс таңбаланбаған және 23 компанияның тек 7-і шығарған өнімдерге дұрыс таңбалау жүргізген[6].

Етті тауық еті немесе үйрек еті сияқты арзан өнімдермен алмастыру заңсыз және неғұрлым жоғары қаржылық пайда алу үшін пайдаланылады. Бұл жалған әдістер адал бәсекелестікке әсер етуі мүмкін және нарықтағы тұтынушылардың мүдделерін ескермеуі мүмкін [7, 8]. Ет өнімдерін бұрмалауға шектеулер енгізетін нормативтік актілер қабылданды. Осы заңнамалық ережелерді іске асыру үшін өндірушілер немесе дистрибьюторлар мәлімдеген ет түрлерінің түпнұсқалығын талдаудың сенімді әдістеріне сұранысы артып келеді. Сондықтан нарықтық тәжірибені қадағалау үшін құс етін (тауық, үйрек) сәйкестендірудің арнайылық, сезімтал және тиімді әдісі өте маңызды. Алаяқтықты анықтау үшін Оңтүстік Кореяда шошқа еті (*Sus scrofa*), тауық еті (*Gallus gallus*) және сиыр еті (*Bos taurus*) сияқты әртүрлі ет үлгілерінен mtDNA (митохондриялық ДНҚ) көмегімен зерттеу жүргізілді. Нәтижесінде, 0.1%-ға жуық мәлімделмеген жануарлар түрлерін анықтады [9].

Ет өнімдерінің фальсификациясын сәтті анықтау үшін қажетті ДНҚ-ны іріктеу және оқшаулау әдістерін мұқият қарастыру қажет. Қазіргі уақытта әртүрлі ферменттер мен реагенттерді қосу арқылы ДНҚ-ны оқшаулаудың көптеген түрлі әдістері, сондай-ақ ДНҚ-ны оқшаулауға арналған арнайы дайын жиынтықтар бар. Бұл кезең ең маңызды, сондықтан қолайлы нұсқаны таңдау ең бірінші және ең маңызды міндет болып табылады.

ДНҚ-ны ет пен ет өнімдерінен оқшаулау кезінде өнімнің құрамы, майдың мөлшері, талшықтың түрі, тіпті ДНҚ-ның қай мүшеден алынғаны және басқалары сияқты көптеген кедергілер бар. Жануарлардың әртүрлі тіндерінен, ұқсас бастапқы мөлшермен алынған ДНҚ мөлшеріндегі айырмашылықтарды Ивоби және басқалар 2015 жылы анықтаған [10]. Бұл айырмашылықтар әртүрлі тіндердегі ақуыздың өзгеруіне байланысты болуы мүмкін. Сондай-ақ ет өнімдерін өндірушілердің рецепті маңызды рөл атқарады, себебі ол ДНҚ-ны оқшаулаудың күрделілік деңгейіне әсер етуі мүмкін. Сонымен қатар майлы тіндердің көп мөлшері және оны алып тастаудың күрделілігі оқшауланған ДНҚ-ның соңғы концентрациясы мен тазалығына әсер етуі мүмкін.

Сондай-ақ балық пен балық өнімдерінен ДНҚ оқшаулау кезінде ұқсас проблемалар байқалды. ДНҚ-ны оқшаулау әдістерінің тиімділігіне әртүрлі балық түрлері арасындағы бұлшықет тіндерінің құрамындағы айырмашылық әсер етуі мүмкін. 2011 жылы Которн, Стейнман және Виттхун Оңтүстік Африканың 29 сәулелі балықтарына ДНҚ алудың әртүрлі әдістеріне салыстырмалы зерттеу жүргізді. Бұл зерттеу SureFood® PREP әдісінің ДНҚ-ның едәуір жоғары концентрациясы мен тазалығын алудағы тиімділігі анықталды. Алайда, 29 үлгінің тек 15-інде оқшауланған ДНҚ тазалығының қолайлы диапазоны болды [11].

Қазіргі уақытта ет өнімдерінің түрлік бұрмалануын анықтаудың ең заманауи, жоғары сезімтал және арнайылы экспресс әдісі нақты уақыт режиміндегі полимеразды тізбекті реакция әдісі болып табылады. Бұл әдіс – ПТР тест-жүйелерін және арнайы жабдықты – ПТР күшейткіштерін зерттеуге арналған жиынтықтарды қолдануды қамтиды.

Қазақстанда негізінен өсімдік тектес генетикалық түрлендірілген объектілерді CONGEN (Германия), GENIAL (Германия), GENERON (Италия) сияқты шетелдік өндірушілердің ет өнімдерін түрлік фальсификациясын анықтауға арналған ПТР тест-жүйелері ұсынылған. Осыған байланысты қазіргі уақытта азық-түлік қауіпсіздігі проблемаларын жергілікті зерттеу және диагностикалық тест-жүйелерді әзірлеу белсенді жүргізілуде.

Бұл зерттеудің мақсаты нақты уақыт режиміндегі полимеразды тізбекті реакция әдісімен тамақ өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау үшін тест-жүйені әзірлеу болды.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу объектілері Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің "Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы" ШЖҚ РМК базасында әзірленген нақты уақыт режиміндегі мультиплексті полимеразды тізбекті реакция әдісімен тамақ өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау жөніндегі хаттама болды.

Хаттама ПТР сынақтан өткізу және оңтайландыру бойынша эксперименттер жүргізу үшін жануарлардың 9 түрінің (сиыр еті, жылқы еті, тауық еті, күркетауық, үйрек, шошқа еті, қоян, балық уылдырығы, қой еті) және өсімдіктердің екі түрінен (жүгері және соя) оқшауланған ДНҚ үлгілері бақылау үлгілері болды. Аталған ет, соя және жүгері үлгілері бірнеше даналап сауда жүргізетін дүкендерден сатып алынды.

Ет және ет өнімдеріне алынған сынамаларды тасымалдау, сақтау және талдауға дайындау

Жұмыс МЕМСТ 31719-2012 сәйкес орындалды. Сынамаларды іріктеу тамақ өнімдерінің біртекті топтары үшін сынамаларды іріктеу тәртібін белгілейтін мемлекеттік стандарттар бойынша жүргізілді - МЕМСТ 7631, МЕМСТ 9792, МЕМСТ 10852, МЕМСТ 12430, МЕМСТ 13341, МЕМСТ 26312.1, МЕМСТ 26313, МЕМСТ 27668.

ПТР әдісімен жануарлардан алынатын тамақ өнімдерін зерттеу үшін сынамаларды іріктеу айқаспалы контаминация (бір үлгінің екіншісімен ластануы) болмайтындай етіп жүргізіледі. Ол үшін сынамаларды іріктеуді қолғаппен жүргізеді, ал материалды іріктеу және ұсақтау үшін қолданылатын құралдарды бір рет пайдаланады немесе жуу құралдарымен өңдейді және бір сынамадан екіншісіне ауысқан кезде спиртовка немесе газ оттығының жалынында стерильдейді. Сынамаларды іріктеу таза шыны, пластикалық ыдысқа немесе бір рет қолданылатын пластикалық пакеттерде жүргізеді.

Сынамаларды тасымалдау оларды сақтау үшін ұсынылған температурада жүзеге асырылады. Тасымалдау ұзақтығы зерттелетін материалдың жарамдылық мерзімінен аспауы тиіс. Зерттелетін материалдың сынамаларын өндіруші көрсеткен шарттарға сәйкес 1 ай бойы (қайта талдау қажет болған жағдайда) сақтайды.

Үлгілер бойынша МЕМСТ 31719-2012 дайындалды. Тығыз консистенциялы материалдарды (блоктардағы ет, механикалық қайта қақтау еті, фарш бұйымдары, консервілер мен консервіленген азықтар, шұжық және т.б.) зерттеу кезінде зерттеуге келіп түскен үлгіден (тұтыну қаптамасынан) кемінде 3 аспа (әрқайсысы 5г) алынады және блендер арқылы ұсақталады. Ұсақталған материал өлшемі 20x30 см бір реттік герметикалық жабылған 50 мл-лік пробиркада сақтайды.

Сынамалардан ДНҚ-ны оқшаулау

Үлгілерді дайындағаннан кейін қолдану жөніндегі нұсқаулыққа сәйкес Applied Biosystems PrepMan Ultra (TermoFisher, АҚШ) жиынын пайдалана отырып, ДНҚ бөліп шығарылды [6].

Алдымен, 2 мл микроцентрифугаға арналған бұрандалы қақпағы бар пробиркаға немесе бұрандалы қақпағы бар басқа қолайлы пробиркаға әр үлгі 20 мг өлшенеді. 400 мкл, көлемі 50 мл конустық пробиркаға немесе басқа стерильді пробиркаға PrepMan Ultra реагенттің тиісті мөлшері өлшенеді. 1 мл тамшуырды қолдана отырып, әр 20 мг үлгіге PrepMan™ Ultra 400 мкл реагент асептикалық жағдайда қосылады. Микроцентрифугалық пробиркаларды 100 ° С 10 минутқа орнатылған жылу блогына салынады. Кейін жылу қондырғысынан үлгілері бар пробиркаларды алынады және бөлме температурасына дейін 2 минут салқындатылады. Пробиркаларды минутына 12000 айналымға 2 минут бойы центрифугалайды. 50 мкл супернатант бұралған пробиркалардан екінші пробиркалар жиынтығына ауыстырылады. Талдаудың әр реакциясы үшін 5 мкл супернатант қолданылады.

Бөлініп алынған ДНҚ-ның концентрациясы мен тазалығын анықтау

Оқшауланған ДНҚ концентрациясы NanoDrop 2000 спектрофотометрін (TermoFisher, АҚШ) пайдалану нұсқаулары мен бағдарламалық жасақтамаға сәйкес фотометриялық түрде бағаланды. ДНҚ тазалығы OD 280/260 және OD 260/230 мәндерін өлшеу арқылы анықталды.

Үлгіні алу үшін тұтқаны көтеріп, үлгіні төменгі өлшеу тірегіне тамшыланады. Көлемі 1-2 мкл болатын үлгі өлшеу тұғырына тамшуырман орналастырылады. Тұтқаны төмендетіп, компьютердегі бағдарламалық жасақтаманың көмегімен спектрлік өлшеу басталады. Үлгілер бағаны автоматты түрде жоғарғы және төменгі тіректер арасында тартылып, өлшеу жүргізіледі. Өлшеу аяқталғаннан кейін сынама алу үшін тұтқаны көтеріп, үлгіні жоғарғы және төменгі тіректерден құрғақ, зертханалық матамен сүртіледі. Қарапайым сүрту концентрациясы 1000 еседен астам өзгертін үлгілер үшін кейінгі өлшеулерде үлгіні тасымалдауға жол бермейді.

Электрофорез әдісімен бөлінген ДНҚ анықтау

Агарозды гель электрофорезі-ДНҚ фрагменттерін бөлудің, анықтаудың және тазартудың стандартты әдісі. Бромды этидиямен, яғни флуоресцентті интеркалярлық бояумен, төмен концентрацияда геледегі ДНҚ-ны оның локализациясын анықтауға болады [12].

Электрофорезбен жұмыс басталғанға дейін арнайы буфер дайындау және агарозды гель дайындау сияқты дайындық жұмыстары жүргізілді. 10xTBE буфер 1xTBE жұмыс буферін дайындау үшін тазартылған сумен сұйылтылды, ол геледі дайындауда және электрофоретикалық камераны толтыру үшін қолданылды. Содан кейін агарозды геледі дайындау үшін 49,25 мл 1xTBE буфер және 0,75 г агароза қолданылды. Сондай-ақ, гелеге 4 мкл этидий бромиді қосылды. Ет пен ет өнімдерінен бөлінген ДНҚ концентрациясы (200-ден 4000 НП-ға дейін) үшін агарозды геледің ұсынылатын концентрациясын, яғни 1,5% қолданды.

Алынған ДНҚ мен қолдану буфері 1:1 қатынасында (әрқайсысы 10 мкл) таза 1,5 мл пробиркада араластырылды, ал маркер 5 мкл көлемінде алынды. Пробиркалардан жұмысқа геледегі әр тесікке 8 мкл үлгі қолданылды. Электрофорез процесі 80V кернеуде 30 минут өткізілді.

Жоғары спецификалық праймерлерді таңдауға жарамды генетикалық маркерді таңдау

Жоғары спецификалық және сезімтал ПТР тест жүйелері генетикалық маркер (нысана) митохондриялық ген сияқты бірнеше көшірмелері бар ген болған кезде жасалуы мүмкін екендігі белгілі. Бұл зерттеуде генетикалық маркер ретінде тауықтың ДНҚ-ны (*Gallus gallus*) анықтау үшін митохондриялық цитохромның В аймағы таңдалды.

Консервативті учаскелерге тікелей және кері праймерлерді (олигонуклеотидтер) және флуоресцентті зондтарды таңдау NCBI (GenBank) мәліметтер базасынан алынған PCR Primer Design/DNASTAR бағдарламалық жасақтамасын қолдана отырып, митохондриялық цитохром В генінің реттілігін теңестіру деректері негізінде жүргізілді. Мақсатты емес тізбекті тазарту ерекшелігі PrimerBlast NCBI интернет-ресурсын пайдалану арқылы жүзеге асырылады.

Праймерлер мен флуоресцентті зондтарды таңдау тиімділігін бағалау ПТР хаттамаларының сезімталдығы мен арнайылығын бағалау арқылы нақты уақыт режимінде ПТР қою кезінде, тестілеу және оңтайландыру кезеңдерінде жүргізілді. Тиімділік екі критерий бойынша анықталды – шекті деңгейдің мәні (Ct) және флуоресценция сигналы (Rn).

ПТР хаттамасының шарттарын оңтайландыру

Мақалада тауық ДНҚ-сы және генетикалық түрлендірілген объектілердің маркерлерін анықтауға арналған ПТР тест жүйелерін жасау бойынша алынған тәжірибені ескере отырып, праймерлер мен флуоресцентті зондтар бір форматта таңдалды. Егер бақылау үлгілерінде мақсатты ДНҚ-ның 0,1% мөлшерінде амплификация байқалатын болса, бұл рұқсат етілген жұмыс концентрациясы болып саналады.

Тестілеу және оңтайландыру кезеңінде сезімталдық пен арнайылықты бағалау деректері негізінде хаттаманың тиімділігі бағаланды. Тестілеу үшін таңдалған параметрлер қолданылды (реагенттердің концентрациясы, тазарту температурасы және т.б.), оңтайландыру кезінде бұл параметрлер түзетілді.

Праймерлерді күйдіру температурасы бағдарламалық жасақтаманы қолдана отырып алынған мәліметтер негізінде және ZNA типті сөндіргішті (Metabion, Германия) пайдалану кезінде күйдіру температурасының өзгеруін ескере отырып таңдалды. Праймерлерді күйдіру температурасын таңдау 59-дан 61 °C-қа дейін жүргізілді (1 кесте).

Кесте 1

Күйдіру температурасын таңдау

Праймер/зондтың атауы	Күйдірудің есептік температурасы (°C)	Күйдіру температурасы №1 (°C)	Күйдіру температурасы №2 (°C)	Күйдіру температурасы №3 (°C)
JCHF1	63	60	59	61
JCHR1	62,1	60	59	61
JCHP1	55,3	60	59	61

Сезімталдықты бағалау үшін ДНҚ сұйылтуды дайындау

Сезімталдық полимеразды тізбекті реакцияны нақты уақыт режимінде ДНҚ бақылау үлгісінің белгілі концентрациясы бар сұйылту сериясымен бағалау кезінде бағаланды. Хаттама ПТР сезімталдығын бағалау үшін бақылау үлгісінің ДНҚ-ны бес рет сұйылту дайындалды 10%, 1%, 0,1%, 0,01, 0,001%. Тауықтың ДНҚ-сы соя ДНҚ-ны өсірді. Тестілеу үшін әрқайсысының 3 соңғы сұйылтылған ертіндісін үш рет қайтала қолданылды. 20 мкл реакция қоспасына 10 мкл көлемінде ДНҚ қосылған кезде реакция көлемі 30 мкл болды. Түтіктегі сұйылтылған ДНҚ-ның жалпы концентрациясы 100 нг құрады. Матрицасыз ПТР қоспасы теріс бақылау үлгі ретінде қызмет етті (2 кесте). ПТР кезінде цикл кезінде бағдарлама әр цикл үшін репортер шығарындыларын есептеді. Нақты уақыттағы ПТР жүйесі көп компонентті алгоритмді қолдана отырып, әр компоненттің бояғыш спектріне үлесін анықтай алатын бағдарламалық жасақтамамен бірге келеді. RN мәні ПТР күшейту кезінде әр цикл үшін репортер жасаған қалыпты флуоресценттік сигналдың мөлшерін білдіреді. Күшейту графигі шекті кесіп өтетін нүкте Ct (шекте деңгей) ретінде анықталады. Сәтті амплификацияның қолайлы параметрлері флуоресценция сигналының (RFU) барынша ұлғаюымен шекте деңгейдің (Ct) ең аз ықтимал мәндері кезінде Нысана ДНҚ-ның төмен құрамы (0,1-0,01%) бар амплификация.

Кесте 2

Бір ПТР реакциясына амплификацияны тежеуді ішкі бақылауды қоса алғанда, жануардың бір түрінің ДНҚ-сын анықтау бойынша ПТР жүргізуге арналған қоспаны дайындау хаттамасы

№	Атауы	Қажетті көлем, мкл
1	Нақты уақыт режимінде мультиплексті ПТР жүргізуге арналған Микс (qPCR Multiple Master x2)	9,6
2	ПТР полимераза	0,4
3	Олигонуклеотид forward (10 μ M)	0,8
4	Олигонуклеотид reverse (10 μ M)	0,8
5	TagMan флуоресцентті зонд (10 μ M)	0,6
6	Ішкі бақылау жиынтығы (олигонуклеотидтер мен зондтардың қоспасы)	0,4
7	Fluorescein Reference Dye (10 μ M)	0,2
8	Human genomic DNA (10 нг/мкл)	2
9	PCR-grade water	5,12
10	UNG	0,08
Қоспаның көлемі		20
Зерттелетін ДНҚ (10 нг/мкл)		10
Жиыны		30

Нақты уақыт режиміндегі ПТР CFX96 (Bio-Rad, Германия) амплификаторын пайдалана отырып орындалды (3 кесте).

Кесте 3

Жануардың ДНҚ-сын анықтау үшін ПТР жүргізу кезінде күшейту режимі

ПТР кезеңдері	Температура	Уақыты	Есепке алу арналары және флюорофорлар	Цикл саны
UNG активациясы	50 °C	2 мин	-	1
Денатурацияны бастау және полимеразды активациясы	95 °C	2 мин	-	1

Денатурация	95 °С	15 сек	-	40
Күйдіру	60 °С	60 сек	FAM/HEX	

Сезімталдық пен арнайылықты бағалау үшін ДНҚ сұйылтуын дайындау

Ерекшелігі полимеразды тізбекті реакцияны нақты уақыт режимінде таңдалған праймерлер мен флуоресцентті зондтармен және жануарлар мен өсімдіктердің ДНҚ-ның 11 бақылау үлгілерімен біріктірген кезде анықталды. ДНҚ бақылау үлгілерінің концентрациясы 10 нг/мкл-ге дейін жеткізілді және ПТР жүргізу кезінде ДНҚ-ның жұмыс концентрациясын оңтайландыру және анықтау, сондай-ақ праймерлердің арнайы емес күйдірілуін анықтау үшін пайдаланылды. 20 мкл реакция қоспасына 10 мкл көлемінде ДНҚ қосылған кезде реакция көлемі 30 мкл болды. Нақты уақыт режиміндегі ПТР CFX96 (Bio-Rad, Германия) амплификаторын пайдалана отырып орындалды.

Күшейтуді тежеуді ішкі бақылау ретінде ұзындығы 295 н.ж. жұп адамның геномдық ДНҚ бета-актин генінің фрагменті бар qPCR Control Kit жиынтығы, сондай-ақ оны күшейту үшін праймерлер мен зонд қоспасы қолданылды.

Зерттеу нәтижелері

Бақылау үлгілерін дайындау. ДНҚ-ны оқшаулау және концентрация мен тазалықты өлшеу

Эксперименттер жүргізу үшін жануарлардың 9 түрі (сиыр еті, жылқы еті, тауық еті, күркетауық, үйрек, шошқа еті, қоян, балық уылдырығы, қой еті) және өсімдіктердің екі түрінен (жүгері және соя) алынған әрқайсысының салмағы 50 грамм болатын 11 негізгі үлгі дайындалды. Зерттеу жүргізу үшін 11 негізгі сынамадан, 44 бақылау ДНҚ үлгісі бөлінді. Алынған ДНҚ концентрациясы мен тазалығының мәні матрицаның түріне байланысты өзгерді. Мысалы, шортан уылдырығынан оқшауланған ДНҚ концентрациясы 1 900 нг/мкл-ден асады, ал ет тінінен оқшауланған үйрек 140 нг/мкл-ден асады. Бақылау үлгілері ретінде пайдаланатын оқшауланған ДНҚ концентрациясы бойынша ең тиімді материал жануарлар бауырының, шортан уылдырығының және соя ұнының үлгілері болды (4 кесте).

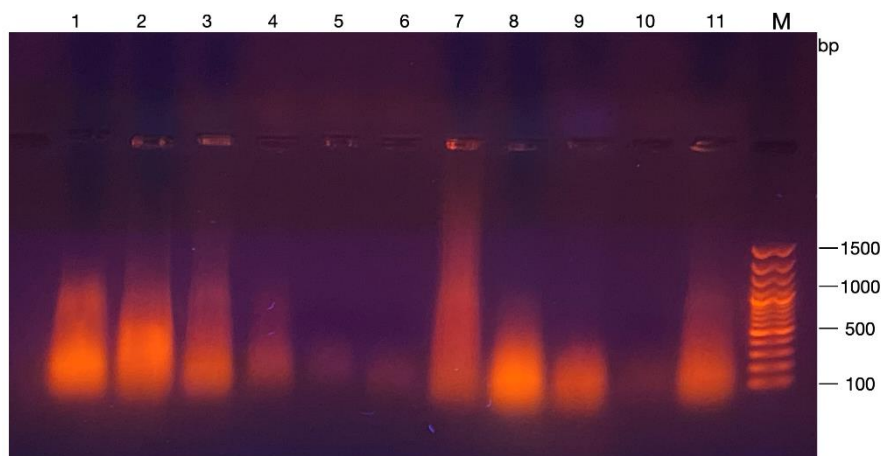
Кесте 4

Бақылау үлгісінен бөлінген ДНҚ концентрациясы және тазалығы

№ Үлгі	Үлгінің аты	Матрицаның түрі	Концентрация диапазоны (нг/мкл)	OD 280/260 орташа мәні	OD 260/230 орташа мәні
1	Балық ДНҚ (шортан)	Уылдырық	1 900-ден жоғары	1,9	1,6
2	Ірі-қара малдың ДНҚ	Бұлшықет тіні	550-ден жоғары	1,4	0,8
3	Қой ДНҚ	Бауыр	670-тен жоғары	1,55	0,9

4	Үйрек ДНҚ	Бұлшықет тіні	140-тан жоғары	2	1,6
5	Тауық ДНҚ	Бұлшықет тіні	740-тан жоғары	3	0,6
6	Күркетауық ДНҚ	Бұлшықет тіні	580-нен жоғары	2,6	0,6
7	Жылқы ДНҚ	Бұлшықет тіні	480-нен жоғары	1,2	0,9
8	Қоян ДНҚ	Бауыр	1 000-нан жоғары	1,5	0,9
9	Сыыр ДНҚ	Бауыр	1 700-ден жоғары	1,3	0,8
10	Соя ДНҚ	Ұн	640-тан жоғары	1,6	0,6
11	Жүгері ДНҚ	Тұқым	470-тен жоғары	2	1,4

ДНҚ оқшаулау процедурасының тиімділігін анықтау үшін ДНҚ концентрациясы, A_{260} / A_{280} сіңіру коэффициенті бағаланды. ДНҚ фрагментациясы 1-суретте көрсетілген.



Сурет 1. Ет үлгілерінен алынған ДНҚ-ның 1,5% агарозды геледегі электрофорез көрінісі

М - Маркер, 1 - КРС, 2 - Тауық, 3 - Қоян, 4 - Күркетауық, 5 - Жылқы, 6 - Үйрек, 7 - Балық, 8 - Қой, 9 - Жүгері, 10 - Соя, 11 - Сыыр.

ДНҚ бақылау үлгілерінің алынған концентрациясы мен тазалығы одан әрі эксперименттер жүргізу үшін жағдайларды қанағаттандырды. PrepMan Ultra ДНҚ оқшаулау жиынтығы (ThermoFisher, АҚШ) ДНҚ-ны жоғары концентрацияда және қысқа мерзімде оқшаулауға мүмкіндік берді. Алынған ДНҚ тазалығы жеткілікті, өйткені зерттеу кезінде ол сұйылтылып, нәтижесінде қолайлы мәндерге жетеді. Бұл жинақ ДНҚ-ны басқа матрицалармен араласпайтын бір компонентті үлгілерден оқшаулау үшін жарамды.

Жоғары спецификалық праймерлерді таңдауға жарамды генетикалық маркерді таңдау. Праймерлер мен флуоресцентті зондтарды таңдау

Жоғары спецификалық праймерлерді таңдау үшін маркер (нысана) ретінде сезімталдық пен арнайылыққа қатысты ең тиімді митохондриялық ген, атап айтқанда етті анықтау үшін митохондриялық ДНҚ цитохромының В аймағы таңдалды. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде цитохром b митохондриялық генінің бірізділігін теңестіру деректерін талдау негізінде және PCR Primer Design/DNASTAR бағдарламалық жасақтамасын және PrimerBlast NCBI интернет ресурсын пайдалану арқылы консервативті учаскелерге праймерлер мен флуоресцентті зондтар таңдалды (5-кесте).

Кесте 5

Эксперименттер жүргізу үшін іріктелген праймерлер мен флуоресцентті зондтардың реттілігі

Нысананың атауы	Олигонуклеотидтер және флуоресцентті зондтар	Тізбегі
Тауық етінің ДНҚ-сы	Тікелей праймер JCHF1	TCT---CT-----C
	Кері праймер JCHR1	G—TA----GG-----G
	Зонд JCHP1	HEX-CA-----TA----A- ZNA-4-BHQ-2
	Зонд JCHP2	ROX-CA-----TA----A- ZNA-4-BHQ-2

Апробация және оңтайландыру кезеңдерінде хаттаманың ПТР сезімталдығы мен арнайылығын бағалауды жүзеге асыру кезінде праймерлер мен флуоресцентті зондтарды іріктеу тиімділігіне бағалау жүргізілді.

ПТР хаттамасының шарттарын оңтайландыру

Нақты уақыт режиміндегі мультиплексті ПТР хаттамасын тексеру мен оңтайландырудың негізгі мақсаттарының бірі - ПТР-дің жалғыз жүйелері үшін салыстырмалы келетін, түгел мақсатты тізбектер үшін ПТР-дің жоғары тиімділігін арттыру.

Атап айтқанда, егер дуплексті ПТР-де жалғыз мақсатты тізбектің артық мөлшері болса, онда мөлшері кіші тізбекті күшейту процесі, бәсекелестік әсерінен басылып қалуы мүмкін. Барлық мақсаттарды күшейту оңтайлы жағдайларын қамтамасыз ету үшін көптеген параметрлерді ескеру қажет, мысалы, полимераза концентрациясы, нуклеотидтер және буферлік құрам, соның ішінде магний тұзының концентрациясы. Қазіргі уақытта нақты уақыт режиміндегі мультиплексті ПТР жүргізу үшін мастер-микстері бар коммерциялық жиынтықтардың көбірек ұсынылуына байланысты әдістемені оңтайландыру мастер-микс жиынтықтарының ингредиенттерінің шоғырлануын оңтайландыруға бағытталмаған.

Егер бқылау үлгілерінде мақсатты ДНҚ-ның 0,1% мөлшерінде амплификация байқалатын болса онда, бұл рұқсат етілген, жұмыс концентрациясы болып саналады. Тестілеу және оңтайландыру кезеңінде сезімталдық пен арнайылықты бағалау деректері негізінде хаттаманың тиімділігі бағаланды. Тестілеу үшін таңдалған параметрлер қолданылды (реагенттердің концентрациясы, тазарту температурасы және т.б.), оңтайландыру кезінде бұл параметрлер түзетілді.

Хаттаманың ПТР сынағы, қоспа ингредиенттерінің құрамы мен қолданылатын концентрациясының таңдалған параметрлеріне сәйкес жүргізілді. Праймерлер мен зондтарды

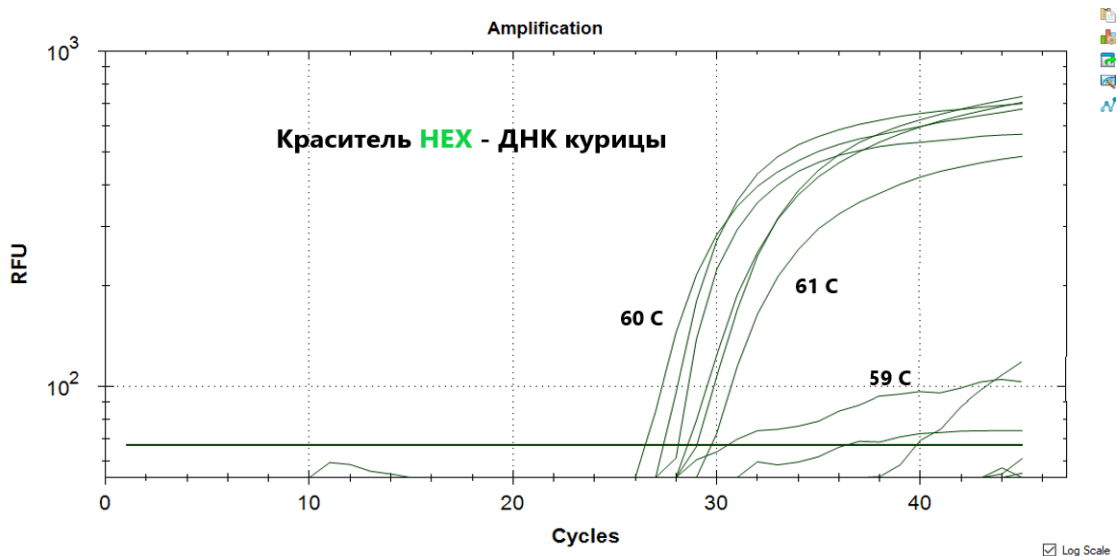
күйдіру температурасын таңдау бойынша жүргізілген зерттеулер нәтижесінде оңтайлы күйдіру температурасы C_t шекті деңгейінің ең төменгі мәндері және флуоресценцияның жоғары сигналы (RFU) байқалған 60°C температура екендігі анықталды. ПТР хаттамасының шекті деңгейінің орташа мәні 24,2-ден 25,6-ға дейін өзгерді, ал флуоресценция сигналының деңгейі ПТР хаттамасы үшін 102 болды (6 кесте).

Кесте 6

Праймерлер мен флуоресцентті зондтарды күйдіру температурасы кезінде іріктеу тиімділігінің нәтижелері 60°C

Нысана	Олигонуклеотидтер және флуоресцентті зондтар	Шекті деңгейдің орташа мәні (C_t)	Флуоресценция сигналының орташа мәні (RFU)
ОБУ (оң бақылау үлгі) Тауық еті ДНҚ-сы	Тікелей праймер JCHF1	24,2	10 ²
	Кері праймер JCHR1		
	Зонд JCHP1		

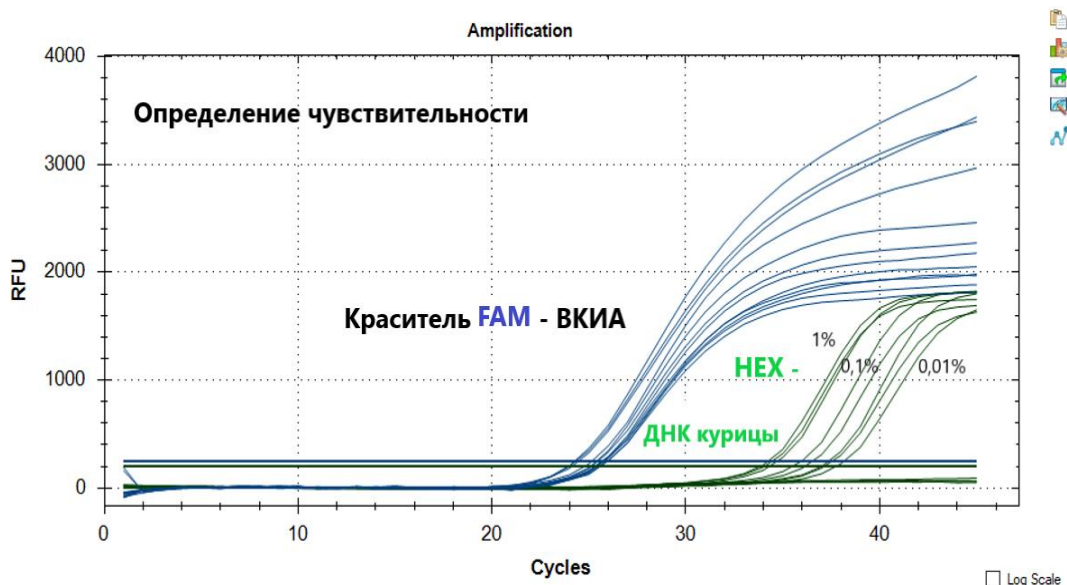
Мысал ретінде 2 суретте тауық етінің ДНҚ-ны анықтау хаттамасы үшін праймерлер мен флуоресцентті зондты тазарту температурасын таңдау нәтижелері көрсетілген.



Сурет 2. Күйдіру температурасында тауықтың митохондриялық ДНҚ геномының белгілі бір бөлігін күшейту нәтижелері 59, 60, 610с (n-9) праймерлер мен флуоресцентті зондтар

Зерттеуде ұсынылған нақты уақыт режимінде ПТР жүргізуге арналған хаттама бізге тауық етінің ДНҚ-сын өте кең ауқымда анықтауға мүмкіндік берді. ДНҚ-ның күшейту соя ДНҚ матрицасында 0,01-10% аралығында айқын байқалды.

Сонымен, ПТР дуплексті хаттама үшін тауық пен күркетауық етінің ДНҚ-ны анықтау үшін 0,1% болды (3 сурет).

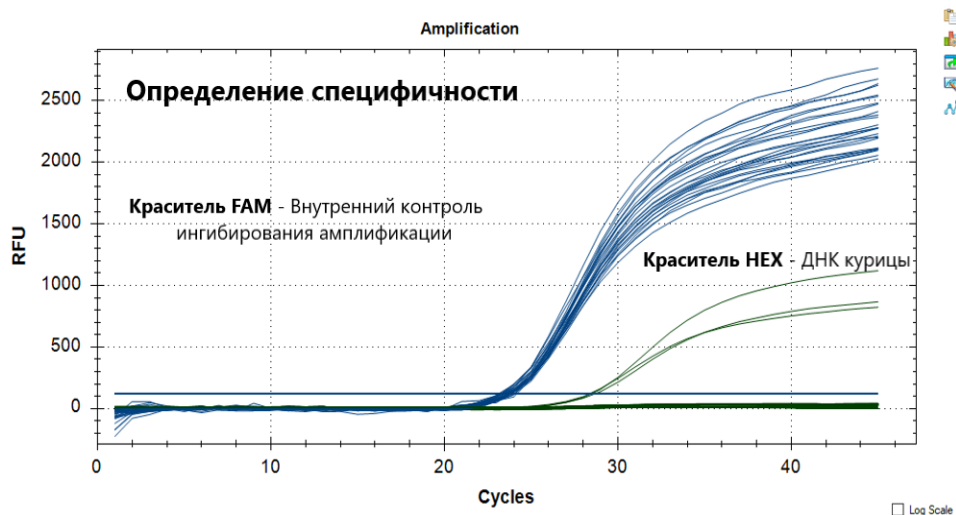


Сурет 3. Тауық етінің ДНК анықтау бойынша хаттамасының ПТР сезімталдығын бағалау нәтижелері (n=9)

Шекті сезімталдықтың алынған нәтижелері тест-жүйелердің ПТР тұтынушысының мәлімдеген талаптарына жауап береді.

4-суретте жануарлар мен өсімдіктердің ДНҚ-ның 11 бақылау үлгісімен полимеразды тізбекті реакцияны нақты уақыт режиміне қою кезінде хаттаманың ПТР арнайылығын бағалау деректері келтірілген. ДНҚ бақылау үлгілерінің зерттелген концентрациясы пробиркада 100 нг құрады. Тауық етінің ДНҚ-ны анықтау хаттамасын бағалау кезінде ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін күшейту тек құрамында тауық ДНҚ бар бақылау үлгілерінде байқалды

Эксперименттер жүргізу кезінде бақылау үлгілерінің ДНҚ бөлімдерін спецификалық емес күшейту табылған жоқ.

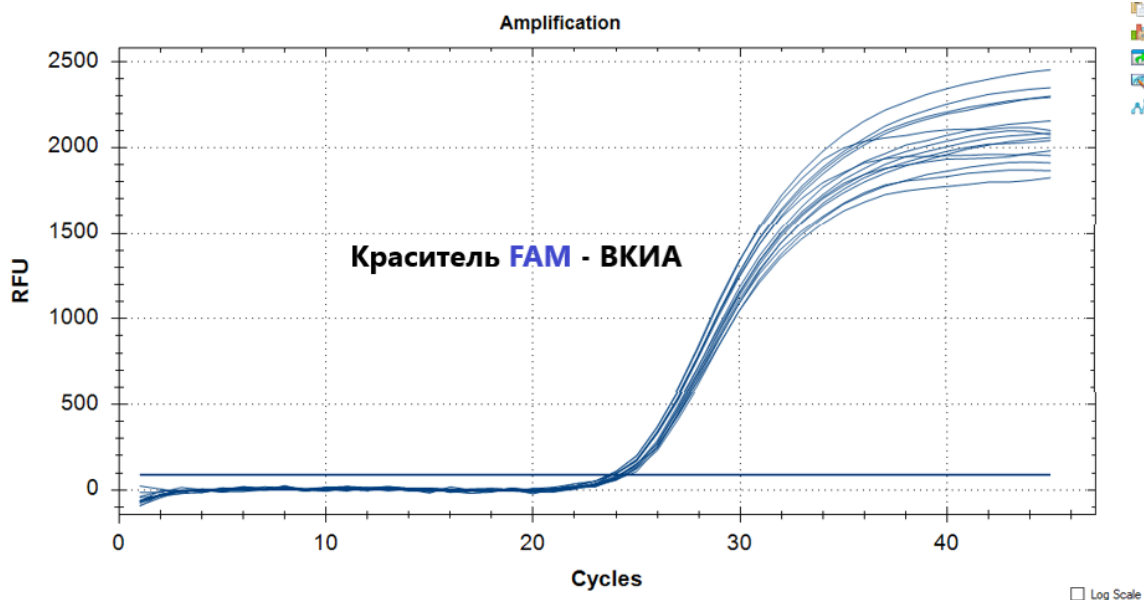


Сурет 4. Тауық етінің ДНК анықтау бойынша хаттаманың ПТР арнайылығын бағалау нәтижелері (n=33)

Амплификацияны тежеудің ішкі бақылауы ретінде (ВКИА) ұзындығы 295 н.ж. жұп адамның геномдық ДНҚ бета-актин генінің фрагменті бар qPCR Control Kit жиынтығы, сондай-ақ оны амплификациялау үшін праймерлер мен зондтың қоспасын пайдаланды.

ПТР хаттамаларына арналған эксперименттерде 1 ПТР реакциясына 2 мкл көлемінде 10 нг/мкл адамның геномдық ДНҚ концентрациясы және праймерлер мен зондтардың 0,4 мкл қоспасы қолданылды.

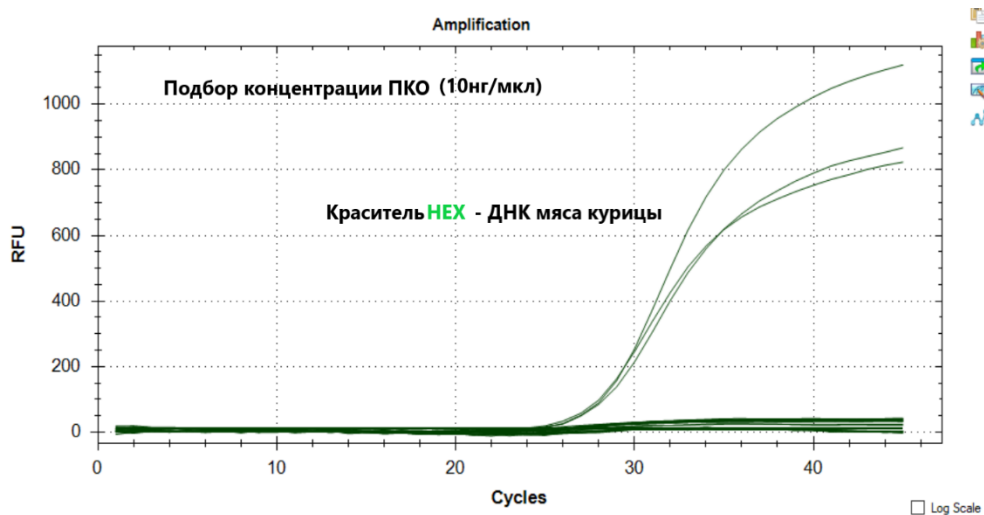
Пайдаланылған шоғырланулар жалпы қабылданған өлшемдерге сәйкес келді-ішкі бақылаудың СТ шекті деңгейінің мәні 23-тен 26-ға дейінгі диапазонда болды (5-сурет).



Сурет 5. Сапаны бағалау нәтижелері

ПТР дуплексті хаттамасында пайдаланылған амплификацияны тежеудің ішкі бақылауы

Нақты уақыт режиміндегі ПТР жүргізу үшін 10 нг/мкл жұмыс концентрациясын, оң бақылау үлгісін (ОБУ) пайдаланды (6 сурет).



Сурет 6. Тауық етінің ДНҚ-ны қою кезінде күшейту нәтижелері дуплексті ПТР. ОБУ концентрациясы 10 нг/мкл болды

Қорытынды

Ет өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау үшін ПТР тест-жүйелерін отандық нарықтың жыл сайынғы қажеттілігіне сәйкес нақты уақыт режиміндегі полимеразды тізбекті реакция әдісімен және амплификацияны тежеуді ішкі бақылауды қамтитын тауықтың ДНҚ-ны анықтау бойынша ПТР хаттамасын анықтады және іске асырды. ПТР хаттамаларының жоғары аналитикалық сезімталдығы мен арнайылығы оларды тауықтың ДНҚ-ны анықтау үшін жедел диагностикада қолдануға мүмкіндік береді.

Нақты уақыт режиміндегі ПТР әдісімен тамақ өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау бойынша хаттама оңтайландырылды. Ол үшін жануарлардың митохондриялық cytochrome B гені негізгі генетикалық маркер ретінде таңдалды. Праймерлер мен флуоресцентті зондтар таңдалды. Нақты уақыт режимінде ПТР әдісімен тамақ өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау бойынша сезімталдықты, арнайылығын, дұрыстығын, тұрақтылығын және хаттамаларын бағалау жұмысы жүргізілді. ДНҚ-ның коллекциялық үлгілерінде, сондай-ақ тамақ өнімдерінің үлгілерінде нақты уақыт режимінде ПТР әдісімен тамақ өнімдерінің түрлік фальсификациясын анықтау бойынша әзірленген хаттама апробацияланды.

ПТР хаттамасы арнайылықты анықтау үшін ДНҚ үлгілерінің коллекциясына сыналып және сезімталдықты анықтау үшін әртүрлі ДНҚ мазмұны бар ПТР қойылды, амплификацияны тежеуді ішкі бақылаудың оңтайлы концентрациясы таңдалды, сезімталдықтың оңтайлы концентрациясы таңдалды.

Қаржыландыру. Бұл зерттеуді Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігінің Ғылым комитеті қаржыландырады (Грант № AP 08052580).

Әдебиеттер тізімі

1. Derz W., Pavlovic M., Huber I., Schalch B., Gerdes L. Food fraud in the Alps? - Detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) in firm raw sausages, ham, and meat via qualitative duplex real-time PCR // *Food Control*. – 2021. – Vol. 123. – P. 107764. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107764>.
2. Grammenos A., Paramithiotis S., Drosinos E.H., Trafialek J. Labeling accuracy and detection of DNA sequences originating from GMOs in meat products commercially available in Greece // *LWT. Food Science and Technology*. – 2020. – Vol. 137. – P. 110420. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110420>.
3. Salghi R., Armbruster W., Schwack W. Detection of argan oil adulteration with vegetable oils by high-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection // *Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 153. – P. 387-392.
4. Abbas O., Zadavec M., Baeten V., Mikus T., Lesic T., Vulic A., Prpic J. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 246. – P. 6–17. DOI: [10.1016/j.foodchem.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007).
5. Bohme K., Calo Mata P. Review of recent DNA based methods for main food authentication topics // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 67. – P. 3854–3864. DOI: [10.1021/acs.jafc.8b07016](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07016).
6. Elizaquível P., Aznar R. Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables // *J Food Pro*. – 2008. – Vol. 71, № 10. – P. 2110–2114. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.10.2110>.
7. Zheng X., Li Y., Wei W., Peng Y. Detection of adulteration with duck meat in minced lamb meat by using visible near-infrared hyperspectral imaging // *Meat Science*. – 2019. – Vol. 149. – P. 55–62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.11.005>.

8. Amin M.A., Hamid S.B. A., Ali M.E. A method for the detection of potential fraud of bringing feline meat in food chain // International Journal of Food Properties. – 2015. – Vol. 19. – P. 1645–1658. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1107577>.
9. Kingsley D.H. Emerging foodborne and agriculture-related viruses // Microbiology Spectrum. – 2016. – Vol. 4. – P. 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.pfs0007-2014>.
10. Iwobi A., Sebah D., Kraemer I., Losher C., Fischer G., Busch U., Huber I. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 169. – P. 305–313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.139>.
11. Cawthorn D.-M., Steinman H.A., Witthuhn R.C. Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa // Food Control. – 2011. – Vol. 22, № 2. – P. 231–244. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.003>.
12. Sumbrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. In Sumbrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (Eds) Molecular cloning: a Laboratory Manual. – New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. – P. 1626.

Г.К. Абитаева¹, А.К. Шагинова¹, М.Р. Толеубекова¹, Н.А. Кущева¹, А.Б. Абеев²,
З.С. Сармурзина¹

¹РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Астана, Казахстан

²ТОО «ABIOTECH», Астана, Казахстан

Разработка протокола по определению видовой фальсификации пищевых продуктов методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени»

Аннотация. Фальсификация мясных продуктов становится серьезной проблемой во всем мире, включая несоответствующую маркировку, запрещенные добавки или замену дорогих ингредиентов более дешевыми компонентами. Последствия таких манипуляций могут быть опасными для здоровья потребителя, например, пищевая аллергия, отравление. В данной статье разработан протокол для качественного определения ДНК митохондриального генома курицы (*Gallus gallus*) методом цепной реакции полимеразы в режиме реального времени в сырых и термически обработанных мясных продуктах.

Методы. Работа была проведена для определения смесей мяса и мясopодуKтов из курицы, индейки, лошади, баранины, свинины и говядины. Для изучения фальсификации были подготовлены 11 образцов из 9 видов мяса и двух видов растений. С помощью комплектов изоляции ДНК PrepMan Ultra (Thermo Fisher, США) была получена ДНК с высокой концентрацией между 1 900 нг/мкл и 140 нг/мкл. Выбор специфичных праймеров и флуоресцентных зондов осуществлялся на основе выравнивания последовательности митохондриального гена курицы (*Gallus gallus*) в GenBank. Все цепи выровнены с помощью программного обеспечения Primer Designer 3.0 и синтезированы ThermoFisher.

Результаты. В ходе работы был разработан протокол по определению видовой фальсификации пищевых продуктов методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Протокол ПЦР был протестирован на коллекцию образцов ДНК для определения специфичности, ПЦР с различным содержанием ДНК был поставлен для определения чувствительности. ДНК курицы была четко прослежена в матрице ДНК в пределах 0,01-10%.

Заключение. Исследования показали, что разработанный протокол является высокочувствительным и специфическим экспресс-методом определения ДНК курицы методом ПЦР «реального времени», что позволяет использовать их в диагностике выявления ДНК животных.

Ключевые слова: ДНК, мясные продукты, ПЦР, ПЦР в реальном времени, выделение ДНК, фальсификация, чувствительность.

G.K. Abitayeva¹, A.K. Shagirova¹, M.R. Toleubekova¹, N.A. Kushcheva¹, A.B. Abeev²,
Z.S. Sarmurzina¹

¹Republican Collection of Microorganisms, Astana, Kazakhstan

²ABIOTECH LLP, Astana, Kazakhstan

Development of a protocol for determining the specific adulteration of food products by "real-time" polymerase chain reaction

Abstract. Adulteration of meat products is becoming a serious problem all over the world, including inappropriate labeling, prohibited additives, or replacement of expensive ingredients with cheaper components. The consequences of such manipulations can be dangerous for the health of a consumer. For example, it may cause food allergies and poisoning. In this article, there was developed a protocol for the qualitative determination of the DNA of the mitochondrial genome of chicken (*Gallus gallus*) by the polymerase chain reaction in real-time in raw and heat-treated meat products.

The study was carried out to determine mixtures of meat and meat products from chicken, turkey, horse, lamb, pork, and beef. There were prepared 11 samples of 9 types of meat and two types of plants for the study of falsification. DNA isolation kits PrepMan Ultra (Thermo Fisher, USA) were used to obtain DNA with a high concentration between 1,900 ng/ml and 140 ng/ml. The selection of special primers and fluorescent probes was based on the alignment of the sequence of the chicken mitochondrial gene (*Gallus gallus*) from GenBank. All circuits are aligned using Primer Designer 3.0 software and synthesized by ThermoFisher.

The authors have developed a protocol to determine the specific falsification of food products by a polymerase chain reaction in "real-time" mode. The PCR protocol was tested on a collection of DNA samples to determine specificity, and PCR with different DNA content was delivered to determine sensitivity. Chicken DNA was clearly traced in the DNA matrix in the range of 0.01-10%.

Studies have shown that the developed protocol is a highly sensitive and specific express method for determining chicken DNA by a polymerase chain reaction in "real-time" mode, which allows them to be used in the diagnosis of animal DNA detection.

Keywords: DNA, meat products, PCR, real-time PCR, DNA isolation, falsification, sensitivity.

References

1. Derz W., Pavlovic M., Huber I., Schalch B., Gerdes L. Food fraud in the Alps? - Detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) in firm raw sausages, ham, and meat via qualitative duplex real-time PCR, *Food Control*, 123, 107764 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107764>.
2. Grammenos A., Paramithiotis S., Drosinos E.H., Trafialek J. Labeling accuracy and detection of DNA sequences originating from GMOs in meat products commercially available in Greece, *LWT. Food Science and Technology*, 137, 110420 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110420>.
3. Salghi R., Armbruster W., Schwack W. Detection of argan oil adulteration with vegetable oils by high-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection, *Food Chemistry*, 153, 387-392 (2014).
4. Abbas O., Zadavec M., Baeten V., Mikus T., Lesic T., Vulic A., Prpic J. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin, *Food Chemistry*, 246, 6-17 (2018). DOI: [10.1016/j.foodchem.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007).
5. Bohme K., Calo Mata P. Review of recent DNA based methods for main food authentication topics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 3854-3864 (2019). DOI: [10.1021/acs.jafc.8b07016](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07016).
6. Elizaquível P., Aznar R. Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables, *J Food Pro*, 71(10), 2110-2114 (2008). DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.10.2110>.

7. Zheng X., Li Y., Wei W., Peng Y. Detection of adulteration with duck meat in minced lamb meat by using visible near-infrared hyperspectral imaging, *Meat Science*, 149, 5-62 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.11.005>.
8. Amin M.A., Hamid S.B. A., Ali M.E. A method for the detection of potential fraud of bringing feline meat in food chain, *International Journal of Food Properties*, 19, 1645-1658 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1107577>.
9. Kingsley D.H. Emerging foodborne and agriculture-related viruses, *Microbiology Spectrum*. 4, 1-15 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.pfs0007-2014>.
10. Iwobi A., Sebah D., Kraemer I., Losher C., Fischer G., Busch U., Huber I. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat, *Food Chemistry*, 169, 305-313 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.139>.
11. Cawthorn D.-M., Steinman H.A., Witthuhn R.C. Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa, *Food Control*, 22(2), 231-244 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.003>.
12. Sumbrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. In Sumbrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (Eds) *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. (New York, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989, P. 1626).

Авторлар туралы мәлімет:

Абитаева Г.К. – PhD, жоба жетекшісі, ҚР БҒМ ҒК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» РМК, Ш. Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Шагирова А.К. – магистрант, ҚР БҒМ ҒК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» РМК, Ш. Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Төлеубекова М.Р. – магистрант, лаборант, ҚР БҒМ ҒК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» РМК, Ш. Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Кущева Н.А. – биология ғылымдарының кандидаты, ҚР БҒМ ҒК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» РМК аға ғылыми қызметкері, Ш. Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Абеев А.Б. – медицина ғылымдарының кандидаты, директор ЖШС "АБИОТЕХ", ул. Ш. Уалиханова 13/1, Астана, Қазақстан

Сармурзина З.С. – биология ғылымдарының кандидаты, ҚР БҒМ ҒК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» РМК бас директоры, Ш. Уалиханов к-сі 13/1, Астана, Қазақстан.

Abitayeva G.K. – Ph.D., principal investigator, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Sh.Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Shagirova A.K. – Master student, laboratory assistant, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Sh. Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Toleubekova M.R. – Master student, laboratory assistant, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Sh. Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Kushcheva N.A. – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Sh. Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Abeev A.B. – Candidate of Medical Sciences, Director of ABIOTECH LLP, 13/1 Sh. Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.

Sarmurzina Z.S. – Candidate of Biological Sciences, General Director of the Republican Collection of Microorganisms, 13/1 Sh. Valikhanov str., Astana, Kazakhstan.