

ISSN 2518-1467 (Online),
ISSN 1991-3494 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Ш Ы С Ы

ВЕСТНИК

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

THE BULLETIN

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

1944 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С 1944 ГОДА
PUBLISHED SINCE 1944

5

АЛМАТЫ
АЛМАТЫ
ALMATY

2017

SEPTEMBER
СЕНТЯБРЬ
ҚЫРКҮЙЕК

Б а с р е д а к т о р ы

х. ғ. д., проф., ҚР ҰҒА академигі

М. Ж. Жұрынов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

Абиев Р.Ш. проф. (Ресей)
Абишев М.Е. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Аврамов К.В. проф. (Украина)
Аппель Юрген проф. (Германия)
Баймуқанов Д.А. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Байпақов К.М. проф., академик (Қазақстан)
Байтулин И.О. проф., академик (Қазақстан)
Банас Иозеф проф. (Польша)
Берсимбаев Р.И. проф., академик (Қазақстан)
Велихов Е.П. проф., РҒА академигі (Ресей)
Гашимзаде Ф. проф., академик (Әзірбайжан)
Гончарук В.В. проф., академик (Украина)
Давлетов А.Е. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Джрбашян Р.Т. проф., академик (Армения)
Қалимолдаев М.Н. проф., академик (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Лаверов Н.П. проф., академик РАН (Россия)
Лупашку Ф. проф., корр.-мүшесі (Молдова)
Мохд Хасан Селамат проф. (Малайзия)
Мырхалықов Ж.У. проф., академик (Қазақстан)
Новак Изабелла проф. (Польша)
Огарь Н.П. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Полещук О.Х. проф. (Ресей)
Поняев А.И. проф. (Ресей)
Сагиян А.С. проф., академик (Армения)
Сатубалдин С.С. проф., академик (Қазақстан)
Таткеева Г.Г. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Умбетаев И. проф., академик (Қазақстан)
Хрипунов Г.С. проф. (Украина)
Юлдашбаев Ю.А. проф., РҒА корр.-мүшесі (Ресей)
Якубова М.М. проф., академик (Тәжікстан)

«Қазақстан Республикасы Ұлттық ғылым академиясының Хабаршысы».

ISSN 2518-1467 (Online),

ISSN 1991-3494 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы»РҚБ (Алматы қ.)

Қазақстан республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде
01.06.2006 ж. берілген №5551-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 2000 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28, 219 бөл., 220, тел.: 272-13-19, 272-13-18,
www: nauka-nanrk.kz, bulletin-science.kz

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2017

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Муратбаева көш., 75.

Г л а в н ы й р е д а к т о р
д. х. н., проф. академик НАН РК
М. Ж. Журинов

Р е д а к ц и о н н а я к о л л е г и я:

Абиев Р.Ш. проф. (Россия)
Абишев М.Е. проф., член-корр. (Казахстан)
Аврамов К.В. проф. (Украина)
Апель Юрген проф. (Германия)
Баймуканов Д.А. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Байпаков К.М. проф., академик (Казахстан)
Байтулин И.О. проф., академик (Казахстан)
Банас Иозеф проф. (Польша)
Берсимбаев Р.И. проф., академик (Казахстан)
Велихов Е.П. проф., академик РАН (Россия)
Гашимзаде Ф. проф., академик (Азербайджан)
Гончарук В.В. проф., академик (Украина)
Давлетов А.Е. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Джрбашян Р.Т. проф., академик (Армения)
Калимолдаев М.Н. академик (Казахстан), зам. гл. ред.
Лаверов Н.П. проф., академик РАН (Россия)
Лупашку Ф. проф., чл.-корр. (Молдова)
Моход Хасан Селамат проф. (Малайзия)
Мырхалыков Ж.У. проф., академик (Казахстан)
Новак Изабелла проф. (Польша)
Огарь Н.П. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Полещук О.Х. проф. (Россия)
Поняев А.И. проф. (Россия)
Сагиян А.С. проф., академик (Армения)
Сатубалдин С.С. проф., академик (Казахстан)
Таткеева Г.Г. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Умбетаев И. проф., академик (Казахстан)
Хрипунов Г.С. проф. (Украина)
Юлдашбаев Ю.А. проф., член-корр. РАН (Россия)
Якубова М.М. проф., академик (Таджикистан)

«Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан».

ISSN 2518-1467 (Online),

ISSN 1991-3494 (Print)

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5551-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 2000 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18.

www: nauka-nanrk.kz, bulletin-science.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2017

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

E d i t o r i n c h i e f

doctor of chemistry, professor, academician of NAS RK

M. Zh. Zhurinov

E d i t o r i a l b o a r d:

Abiyev R.Sh. prof. (Russia)
Abishev M.Ye. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Avramov K.V. prof. (Ukraine)
Appel Jurgen, prof. (Germany)
Baimukanov D.A. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Baipakov K.M. prof., academician (Kazakhstan)
Baitullin I.O. prof., academician (Kazakhstan)
Joseph Banas, prof. (Poland)
Bersimbayev R.I. prof., academician (Kazakhstan)
Velikhov Ye.P. prof., academician of RAS (Russia)
Gashimzade F. prof., academician (Azerbaijan)
Goncharuk V.V. prof., academician (Ukraine)
Davletov A.Ye. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Dzhrbashian R.T. prof., academician (Armenia)
Kalimoldayev M.N. prof., academician (Kazakhstan), deputy editor in chief
Laverov N.P. prof., academician of RAS (Russia)
Lupashku F. prof., corr. member. (Moldova)
Mohd Hassan Selamat, prof. (Malaysia)
Myrkhalykov Zh.U. prof., academician (Kazakhstan)
Nowak Isabella, prof. (Poland)
Ogar N.P. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Poleshchuk O.Kh. prof. (Russia)
Ponyaev A.I. prof. (Russia)
Sagiyani A.S. prof., academician (Armenia)
Satubaldin S.S. prof., academician (Kazakhstan)
Tatkeyeva G.G. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Umbetayev I. prof., academician (Kazakhstan)
Khripunov G.S. prof. (Ukraine)
Yuldashbayev Y.A., prof. corresponding member of RAS (Russia)
Yakubova M.M. prof., academician (Tadjikistan)

Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

ISSN 2518-1467 (Online),

ISSN 1991-3494 (Print)

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of Information and Archives of the Ministry of Culture and Information of the Republic of Kazakhstan N 5551-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 2000 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz/>, <http://bulletin-science.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2017

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

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

Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan,
National Center of Biotechnology, Republic of Kazakhstan, Astana.

E-mail: meruet79@gmail.com, ruslan.kalendar@mail.ru, a.k_smagulov@mail.ru, lady.iskakova2015@yandex.kz

THE ACCELERATED IDENTIFICATION SPECIFIC DNA OF DIFFERENT TYPES OF ANIMALS IN MEAT AND MEAT PRODUCTS

Abstract. In article is considered the problem of specific falsification of meat raw materials and meat products. Identification of meat raw materials and meat products on the basis of the sequences of retrotranspozons with use of the Inter SINE PCR method is carried out.

In this research, it is reported about development of the species-specific analysis of DNA of the corresponding animal species for the purpose of identification and confirmation of the authenticity of a concrete species of an animal in meat products based on amplification PCR SINE of retrotranspozons.

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

УДК 612.398.7:577.2

М. Т. Нурғалиева, Р. Н. Календарь, А. К. Смагулов, Ж. А. Искакова

Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан,
ГГП Национальный центр биотехнологий КН МОН РК, Астана, Казахстан

УСКОРЕННАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПЕЦИФИЧНОЙ ДНК РАЗНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ В МЯСЕ И МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

Аннотация. В статье рассмотрена проблема видовой фальсификации мясного сырья и готовых мясных продуктов. Проведена идентификация мясного сырья и мясных продуктов на основе последовательностей ретротранспозонов с использованием метода Inter SINE ПЦР.

В данном исследовании сообщается о разработке видоспецифического анализа ДНК соответствующих видов животных с целью идентификации в определении и подтверждении подлинности конкретного вида животного в мясных продуктах, основанной на ПЦР амплификации видоспецифичных SINE ретротранспозонов.

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

Введение. Идентификация происхождения мяса и отслеживаемость – проблемы первостепенного значения в нашем современном обществе, этому свидетельствуют недавние события относительно фальсификации мясных продуктов с незаявленными видами, таких как конина (Premanandh, 2013) [1].

О присутствии незаявленных видов в мясных продуктах докладывали многие исследователи (Ayaz, Ayaz, & Erol, 2006; Özpınar, Tezmen, Gökçe, & Tekiner, 2013) [2, 3].

Другим серьезным аспектом в фальсификации мяса являются религиозные верования; потребление мяса собаки запрещено в исламе и буддизме (Rahman et al., 2014; Soares, Amaral,

Mafra, & Oliveira, 2010), в то время как потребление свинины запрещено в исламе и иудаизме (Nakyinsige, Man, & Sazili, 2012) [4-6].

О замене фальсифицированного мяса в небольшом количестве в мясных продуктах также сообщали и другие исследователи (Ali, M. E., Razzak, M. A., & Hamid, S. B. A. (2014); Flores-Munigua, Bermudez-Almada, & Vázquez-Moreno, 2000; Mousavi et al., 2015) [7-9].

До настоящего времени для идентификации видового происхождения мяса использовались традиционные методы, которые включают физический, сенсорный анализ, анатомические, и гистологические, химические, биохимические, хроматографические, спектрофотометрические, электрофоретические, диффузия иммунных сывороток, иммунологические, и иммуноэлектрофоретические методы (Singh & Neelam, 2011) [10]. Варианты электрофоретических и иммунологических методов использовались, но они были ограничены в определенных аспектах. Эти методы в основном применялись для сырых мясных продуктов из-за их показателей успешности, являющихся зависящим от стабильности белков в продуктах питания (Hsieh, 2006; Lockley & Bardsley, 2000) [11, 12].

ДНК характеризуется относительно более высокой стабильностью в жестких условиях по сравнению со многими белками. Термостабильность и повсеместное присутствие молекул ДНК в большинстве биологических тканей, превращают ДНК в наиболее благоприятную молекулу для определения компонентов в продовольственных тестах на идентификацию (Ali et al., 2015; Hamzah, Mutalib, & Babji, 2013; Lin et al., 2014) [13-15].

Учитывая все эти исследования, 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). Метод ПЦР характеризуется быстротой и легкостью исполнения, непревзойденными показателями чувствительности и специфичности [16-19].

Метод Inter-SINE-ПЦР, заключается в ПЦР, проводимой на геномной ДНК в качестве матрицы с мечеными праймерами, комплиментарными участкам SINE. Праймеры подбирают таким образом, чтобы амплифицировать участки генома, расположенные между соседними копиями SINE. Различия в получаемых картинах связаны с возникновением делеций и вставок в участках ДНК, расположенных между копиями этих повторов. Благодаря содержанию внутри SINEs – подобных элементов консервативных участков ДНК, фланкирующих промотор РНК-полимеразы III. К этим участкам можно подобрать праймер для проведения ПЦР.

Ретротранспозоны содержатся в каждом эукариотическом геноме, который был изучен до настоящего времени. За последние 65 миллионов лет большинство млекопитающих обогатились вставками SINE элементами, которые распространяются по геному посредством синтеза мРНК, которая затем образует ретровирусоподные частицы, которые снова вставляются в геном хозяина и образуя новую копию этого ретротранспозона. Так как большинство SINE семейств различных видов распространились по-разному, поэтому каждая группа млекопитающих имеет значительное количество (около 100,000) видоспецифичных мобильных элементов. Эти большие рассеянные семейства генов служат новыми маркерами, которые идентифицируют ДНК от видов и до порядка, таким образом, обеспечивая специфичные геномные маркеры, которые могут использоваться в ПЦР, чтобы детектировать определенные подмножества геномных последовательностей, уникальных для генома и интересующего вида в смешанных источниках ДНК.

С помощью ПЦР для последовательностей ретротранспозонов можно детектировать фрагмент хромосомы исследуемого организма в смеси ДНК, выделенной из пищевых продуктов [20-25].

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, котлеты и другое) 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 гель-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 [26].

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 Replibase" [27].

Для каждого семейства SINE были получены последовательности, которые были множественно выровнены с помощью инструментов EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) [28].

Консервативные участки ретротранспозонов использовали для дизайна ПЦР праймеров, с помощью программы FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) [29].

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

Подобранные ПЦР праймеры были разработаны в консервативных участках ретротранспозонов, чтобы увеличить эффективность и чувствительность ПЦР амплификации для конкретного вида (генома).

Олигонуклеотиды и TaqMan пробы были разработаны, используя программное обеспечение FastPCR (PrimerDigital, Finland, <http://primerdigital.com/fastpcr.html>) (Kalendar et al. 2011) и приобретены в компании Eurofins Genomics (<http://www.mwg-biotech.com/>) [30].

Каждая пара праймеров была оценена в лаборатории геномики растений и биоинформатики НЦБ на специфичность и чувствительность, используя стандартный ПЦР и электрофорез в агарозном геле. Ни одна из пар праймеров не образовывала межпраймерные димеры, все праймеры показали высокую ПЦР эффективность.

Только те пары праймеров, соответствующие этим критериям, были отобраны для дальнейшего анализа (таблица 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 таблицах 2, 3 представлен разработанный дизайн пар ПЦР праймеров для детекции ДНК человека и разных видов животных в мясных продуктах.

Таблица 2 – Дизайн пар ПЦР праймеров для детекции ДНК человека и разных видов животных в мясных 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'-CCCTGGGATTCTCCAGGCAAG - 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'-TGGCCAGTCTTCTTCCTAG - 3' | 5188 5190 | Определение генома конины | 115 |

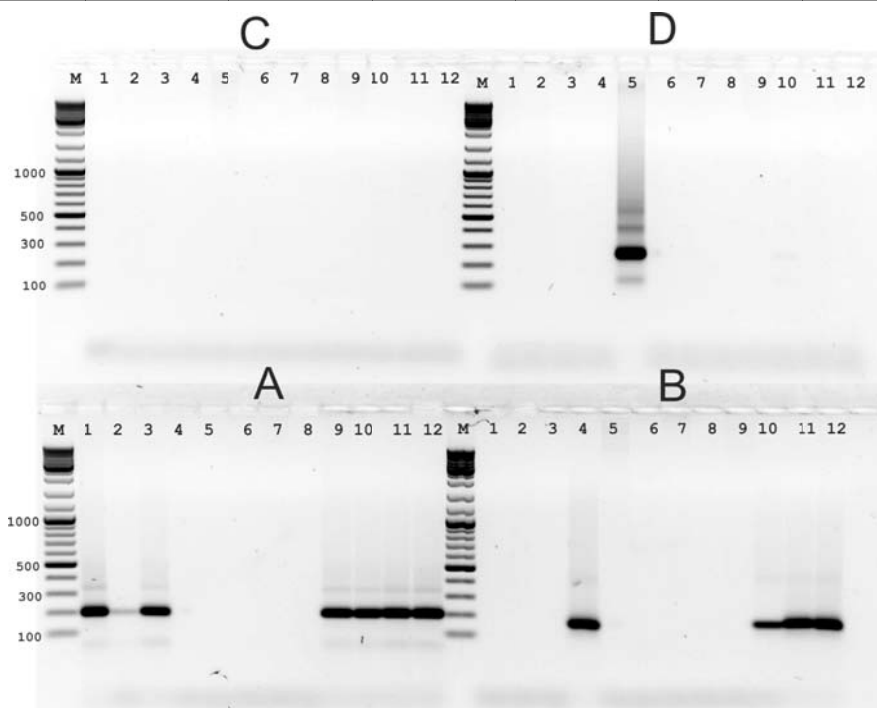
Таблица 3 – Разработанные олигонуклеотидные праймеры для детекции методом Intra-SINE-ПЦР

| Предназначение | Передний праймер/ Forward primer | Обратный праймер/ Reverse primer |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Определение генома человека | 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATCCCA - 3' | 5'-CAGGCTGGAGTGCAGTGG - 3' |
| Определение генома КРС/ овцы | 5'-GAGAAGGCAATGGCACCCCA - 3' | 5'-CCCTGGGATTCTCCAGGCAAG - 3' |
| Определение генома свиньи | 5'-TCCCTGCCCTTGCTCAGTGGGT - 3' | 5'-ATATGGAGGTTCCCAGGCTAGG - 3' |
| Определение генома мыши/крысы | 5'-GGCTGGAGAGATGGCTCAG - 3' | 5'-CAGACACACCAGAAGAGGGCATC - 3' |
| Определение генома собаки | 5'-GATSCCTGGGTGGCKCAG - 3' | 5'-TCGATCCCGGTCTCCAGGAT - 3' |
| Определение генома конины | 5'-CTGTGATGCTGAAAGCTATGCCAC - 3' | 5'-TGGCCAGTCTTCTTCCTAG - 3' |

Таким образом, используя классический ПЦР на основе последовательностей ретротранспозонов 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 таблица 4.

Таблица 4 – 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 |



ПЦР анализ ДНК образцов животного происхождения и продуктов питания. 1 – корова; 2 – лошадь; 3 – баран; 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)

Таким образом, разработанный метод предназначен для ускоренной генетической идентификации видоспецифической 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*) в мясном сырье на основе последовательностей ретротранспозонов с применением Inter-SINE-ПЦР.

Метод является высокочувствительным позволяет достоверно обнаружить необходимый биологический объект при наличии 20 копий в реакции.

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. Применение методов основанных на ДНК как более эффективного подхода для обнаружения и определения видовой идентификации мяса и мясной продукции.

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

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

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

5. 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] Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal –A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34, 568-569.
- [2] Ayaz, Y., Ayaz, N., & Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods*, 17, 214-220.
- [3] Özpınar, H., Tezmen, G., Gökçe, I., & Tekiner, I. H. (2013). Detection of animal species in some meat and meat products by comparatively using DNA microarray and real time PCR methods. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 245-252.
- [4] Rahman, M. M., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Mustafa, S., Hashim, U., & Hanapi, U. K. (2014). Polymerase chain reaction assay targeting cytochrome b gene for the detection of dog meat adulteration in meatball formulation. *Meat Science*, 97, 404-409.
- [5] Soares, S., Amaral, J. S., Mafrá, I., & Oliveira, M. B. P. (2010). Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science*, 85, 531-536.
- [6] Nakyinsige, K., Man, Y. B. C., & Sazili, A. Q. (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 91, 207-214.
- [7] Ali, M. E., Razzak, M. A., & Hamid, S. B. A. (2014). Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects - review. *Food Analytical Methods*, 7, 1933-1949.
- [8] Flores-Munguia, M. E., Bermudez-Almada, M. C., & Vázquez-Moreno, L. (2000). A research note: detection of adulteration in processed traditional meat products. *Journal of Muscle Foods*, 11, 319-325.
- [9] Mousavi, S. M., Khaniki, G. J., Eskandari, S., Rabiei, M., Samiee, S. M., & Mehdizadeh, M. (2015). Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 47-51.
- [10] Singh, V., & Neelam, S. (2011). Meat species specifications to ensure the quality of meat: a review. *International Journal of Meat Science*, 1, 15-26.
- [11] Hsieh, Y. H. P. (2006). Meat species identification. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food science, technology and engineering* (vol. 3). CRC press. pp. 30-01-30-19.
- [12] Lockley, A., & Bardsley, R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 67-77.
- [13] Ali, M. E., Razzak, M. A., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Al Amin, M., & Rashid, N. R. A. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, 177, 214-224.
- [14] Hamzah, A., Mutalib, S. A., & Babji, A. S. (2013). Comparison between Mt-DNA Dloop and Cyt B primers for porcine DNA detection in meat products. In Paper presented at the American institute of physics conference series.
- [15] Lin, C. C., Fung, L. L., Chan, P. K., Lee, C. M., Chow, K. F., & Cheng, S. H. (2014). A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. *Meat Science*, 96, 922-929.
- [16] Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений//Монография. – Одесса, 2011. – С.4 -335.
- [17] Комарова И.Н., Серегин И.Г., Валихов А.Ф. Полимеразная цепная реакция – современный метод выявления фальсификации мясного сырья и продуктов//Мясная индустрия- 2004 - №2 -С.37-41.
- [18] Минаев М.Ю., Фомина Т.А. Полимеразная цепная реакция для идентификации мясного сырья и готовой продукции // Мясные технологии. 2008 - №2 -С.34-36.
- [19] Фомина Т.А., Минаев М.Ю. Система идентификации для контроля халяльной мясной продукции //Мясная индустрия- 2011 - №3 -С.32-34.
- [20] Лаврова О.И., Еланский С.Н. Идентификация SINE-подобных элементов в геноме *Phytophthora infestans* и оценка возможности их применения для сравнительного анализа штаммов//J. Russian Phitopathol. Soc.vol.4, 2003, p.17-22.
- [21] Крамеров Д.А., Васецкий Н.С. Короткие ретропозоны и их использование в филогенетических исследованиях // Молекулярная биология, 2009, т.43, №5, с.795-806
- [22] Банникова А.А., Матвеев В.А., Крамеров Д.А. (2002) Опыт использования интер-SINE-ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих. *Генетика* т.38,№6, с.853-854
- [23] 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

- [24] 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
- [25] 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>
- [26] Proteinase K method for DNA extraction protocol [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://primerdigital.com/dna.html>
- [27] Genetic Information Research Institute (GIRI) [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://www.girinst.org/>
- [28] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Multiple Sequence Alignment (MSA) [Электрон. ресурс].-2016-Режим доступа: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>
- [29] 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>
- [30] Eurofins Genomics. [Электрон. ресурс].-2016 - Режим доступа: <http://www.mwg-biotech.com>

REFERENCES

- [1] Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal –A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34, 568-569.
- [2] Ayaz, Y., Ayaz, N., & Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods*, 17, 214-220.
- [3] Özpınar, H., Tezmen, G., Gökçe, I., & Tekiner, I. H. (2013). Detection of animal species in some meat and meat products by comparatively using DNA microarray and real time PCR methods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 245-252.
- [4] Rahman, M. M., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Mustafa, S., Hashim, U., & Hanapi, U. K. (2014). Polymerase chain reaction assay targeting cytochrome b gene for the detection of dog meat adulteration in meatball formulation. *Meat Science*, 97, 404-409.
- [5] Soares, S., Amaral, J. S., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. (2010). Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science*, 85, 531-536.
- [6] Nakyinsige, K., Man, Y. B. C., & Sazili, A. Q. (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 91, 207-214.
- [7] Ali, M. E., Razzak, M. A., & Hamid, S. B. A. (2014). Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects - review. *Food Analytical Methods*, 7, 1933-1949.
- [8] Flores-Munguia, M. E., Bermudez-Almada, M. C., & Vázquez-Moreno, L. (2000). A research note: detection of adulteration in processed traditional meat products. *Journal of Muscle Foods*, 11, 319-325.
- [9] Mousavi, S. M., Khaniki, G. J., Eskandari, S., Rabiei, M., Samiee, S. M., & Mehdizadeh, M. (2015). Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 47-51
- [10] Singh, V., & Neelam, S. (2011). Meat species specifications to ensure the quality of meat: a review. *International Journal of Meat Science*, 1, 15-26.
- [11] Hsieh, Y. H. P. (2006). Meat species identification. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food science, technology and engineering* (vol. 3). CRC press. pp. 30-01-30-19.
- [12] Lockley, A., & Bardsley, R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 67-77.
- [13] Ali, M. E., Razzak, M. A., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Al Amin, M., & Rashid, N. R. A. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, 177, 214-224.
- [14] Hamzah, A., Mutalib, S. A., & Babji, A. S. (2013). Comparison between Mt-DNA Dloop and Cyt B primers for porcine DNA detection in meat products. In Paper presented at the American institute of physics conference series.
- [15] Lin, C. C., Fung, L. L., Chan, P. K., Lee, C. M., Chow, K. F., & Cheng, S. H. (2014). A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. *Meat Science*, 96, 922-929.
- [16] Sivolap Ju.M., Kozhuhova N.Je., Kalendar' R.N. Variabel'nost' i specifichnost' genomov sel'skohozjajstvennyh rastenij//Monografija. - Odessa, 2011. - S.4 -335.
- [17] Komarova I.N., Seregin I.G., Valihov A.F. Polimeraznaja cepnaja reakcija - sovremennyj metod vyjavlenija fal'sifikacii mjasnogo syr'ja i produktov//Mjasnaja industrija- 2004 - No.2 -S.37-41.
- [18] Minaev M.Ju., Fomina T.A. Polimeraznaja cepnaja reakcija dlja identifikacii mjasnogo syr'ja i gotovoj produkcii //Mjasnye tehnologii- 2008 - No.2 -S.34-36.
- [19] Fomina T.A., Minaev M.Ju. Sistema identifikacii dlja kontrolja haljal'noj mjasnoj produkcii //Mjasnaja industrija- 2011 - No.3 -S.32-34.

[20] Lavrova O.I., Elanskij S.N. Identifikacija SINE-podobnyh jelementov v genome Phytophthora infestans i ocenka vozmozhnosti ih primeneniya dlja sravnitel'nogo analiza shtammov//J. Russian Phitopathol. Soc.vol.4, 2003, p.17-22.

[21] Kramerov D.A., Vaseckij N.S. Korotkie retropozony i ih ispol'zovanie v filogeneticheskikh issledovanijah // Molekulyarnaja biologija, 2009, t.43, No.5,s.795-806

[22] Bannikova A.A., Matveev V.A., Kramerov D.A. (2002) Opyt ispol'zovanija inter-SINE-PCR v izuchenii filogeneza mlekopitajushhih. Genetika t.38,№.6, s.853-854

[23] 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

[24] 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

[25] 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>

[26] Proteinase K method for DNA extraction protocol [Jelektron. resurs].-2016-Rezhim dostupa: <http://primerdigital.com/dna.html>

[27] Genetic Information Research Institute (GIRI) [Jelektron. resurs].-2016-Rezhim dostupa: <http://www.girinst.org/>

[28] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Multiple Sequence Alignment (MSA) [Jelektron. resurs].-2016-Rezhim dostupa: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>

[29] FastPCR is an integrated tool for PCR primers or probe design, in silico PCR, oligonucleotide assembly and analyses, alignment and repeat searching. [Jelektron. resurs].-2016-Rezhim dostupa: <http://primerdigital.com/fastpcr.html>

[30] Eurofins Genomics. [Jelektron. resurs].-2016-Rezhim dostupa: <http://www.mwg-biotech.com>

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

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

ӘР ТҮРЛІ ЖАНУАРЛАР ТҮРЛЕРІНІҢ ЕТІНДЕ ЖӘНЕ ЕТ ӨНІМДЕРІНДЕ ЕРЕКШЕ ДНК ЖЕДЕЛДЕТІЛГЕН СӘЙКЕСТЕНДІРУ

Аннотация. Мақалада ет шикізатын және дайын ет өнімдерінің түрлері жалған проблемасы қарастырылады. Ретротранспозондар негізінде Inter SINE ПЦР әдісін пайдалана отырып ет шикізатын және ет өнімдерінің сәйкестендіру өткізілді.

Бұл зерттеуде ерекше ДНК талдау тиісті жануарлар түрлерін сәйкестендіру мақсатында анықтау және түпнұсқалығын растау нақты мал түрінің ет өнімдерінде SINE ретротранспозондар негізінде ПЦР әдісін пайдалана отырып жобалау туралы қарастырылады.

Түйін сөздер: түрлері жалған, түрлі шығарылған еттің сәйкестендіру, ДНК, Inter SINE ПЦР әдісі, ретротранспозоның консервативті учаскелері, праймерлер, нуклеотидтық жүйелілігі, геном.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1467 (Online), ISSN 1991-3494 (Print)

<http://www.bulletin-science.kz/index.php/ru/>

Редакторы *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, Т. М. Апендиев*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 10.10.2017.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
15,4 п.л. Тираж 2000. Заказ 5.