

УДК/UDC: 637.5:637.068:577.2

DOI 10.21323/2414-438X-2017-2-1-27-36

SELECTION OF DNA MATRIX FOR JUSTIFICATION OF THRESHOLD FOR CONTAMINATION OF PROCESSED MEAT PRODUCTS WITH UNDECLARED POULTRY COMPONENTS

ВЫБОР ДНК МАТРИЦЫ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ПОРОГОВОГО УРОВНЯ ТЕХНИЧЕСКИ НЕУСТРАНИМЫХ ПРИМЕСЕЙ МЯСА ПТИЦЫ В ГОТОВОЙ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Minaev M.Yu, Solodovnikova G.I., Kurbakov K.A.

The V. M. Gorbatov All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени; количественная ПЦР; мясо птицы; технически неустраняемая примесь; фальсификация.

Keywords: real-time PCR, quantitative PCR, poultry meat, mitochondrial DNA, cytochrome B, non-removable impurities, adulteration.

Аннотация

Дифференциация факта фальсификации от случайной перекрестной контаминации сырья на предприятиях мясной промышленности, осуществляющих совместную переработку продуктов уоя сельскохозяйственных животных и птицы, необходима для установления порогового уровня технически неустраняемой примеси. Обоснование пороговых значений, например, мяса кур, требует определения целевой аналитической матрицы, содержание которой в мясном сырье стабильно. В российских аттестованных методиках видоспецифической матрицей выявления ДНК кур является многокопийный ген митохондриальной ДНК цитохрома В. Учитывая, что копияность митохондриальной ДНК может зависеть от типа мышечных волокон, возраста животных и других факторов в данном исследовании обоснована эффективность использования многокопийных митохондриальных генов для квантификации содержания мяса птицы в мясных продуктах. Исследование проб мяса 3 образцов тушек кур разных производителей и 1 образца тушки утки, выделенных из грудных и бедренных мышц показало, что в грудных и бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц содержится приблизительно равное количество митохондриальной ДНК, что позволяет ее использовать в качестве матрицы для обоснования уровня технически неустраняемой примеси готовой мясной продукции мясом кур.

Abstract

Differentiation between adulteration and accidental meat raw material contamination in meat industry enterprises that carry out the combined processing of slaughtering products from farm animals and poultry is necessary to establish a threshold of technically non-removable impurities. Justification of the thresholds, e.g. for chicken meat, requires determination of the target analytical matrix, which content in meat raw material is stable. In the Russian certified methods, the species-specific DNA matrix for chickens is a multi-copy gene of cytochrome B in mitochondrial DNA. Taking into consideration that mitochondrial DNA copy number can depend on a muscle fiber type, animal age, and other factors, the effectiveness of using multi-copy mitochondrial genes for quantifying the poultry content in meat products was justified in this study. Analysis of the samples from the pectoral and hip muscles of three chicken carcasses and one duck carcass obtained from different manufacturers showed that the poultry pectoral and hip muscles contained approximately equal amounts of mitochondrial DNA, which allows its use as a matrix to justify the level of technically non-removable chicken impurities in finished meat products.

Введение

Согласно стратегии развития государственной политики обеспечения качества и безопасности пищевой продукции в РФ приоритетной задачей является обеспечение продовольственного рынка продуктами питания, отвечающим требованиям безопасности, подлинности, качества, а также стимулирование социально-ответственного поведения предпринимательского сообщества при производстве и обращении продукции основанного на принципах добросовестности, формирование рационального потребительского поведения граждан.

Introduction

According to the development strategy of the state policy in food quality and safety, priority in the Russian Federation is to ensure that food products on the market meet the requirements of safety, authenticity, and quality; to promote socially responsible behavior of the business community in the production and distribution of products based on the principles of fair practice; and to build up rational consumer behavior.

Критерии подлинности мясной продукции заложены в соответствующих нормативных документах. Одним из аттестованных в РФ методов подтверждения подлинности мясной продукции является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод является качественным и основан на использовании ПЦР, который позволяет установить видовой состав исследуемой продукции и определить соответствие информации, вынесенной на этикетку.

Тем не менее, в ряде случаев необходимо дать количественную оценку определяемого ингредиента для дифференциации факта фальсификации состава от значений, характерных для технически неустранимой примеси. Однако, для разработки количественной методики необходимы эталонные образцы состава, которых в настоящее время не существует.

Применение ПЦР в реальном времени даже при постановке качественной реакции позволяет приблизительно оценить количество определяемой ДНК и соответственно долю мясного ингредиента в исследуемом мясном продукте. Более того, использование ПЦР в реальном времени позволяет регулировать чувствительность метода по так называемым циклам отсечения положительного результата. Это позволит установить пороговые значения содержания того или иного ингредиента и внести изменения в закон РФ о маркировке пищевой продукции. В законодательстве как Таможенного Союза, так и ЕС содержится требование касательно маркировки аллергенов «В случаях, если компоненты, вызывающие аллергию не использовались при производстве пищевой продукции, но их наличие в пищевой продукции полностью исключить невозможно, информация о возможном наличии таких компонентов размещается непосредственно после указания состава пищевой продукции». Данное требование позволяет информировать потребителя о содержании в продукте незначительных количеств обозначенных аллергенов. Обосновав порог технически неустранимой примеси подобную формулировку можно ввести и в отношении содержания основных видов мясного сырья.

Для обоснования пороговых значений контаминантов необходимо определиться с целевой аналитической матрицей, содержание которой в мясном сырье стабильно. В большинстве ПЦР методов такой матрицей является ген митохондриальной ДНК цитохрома B. В связи с тем, что в клетках мышечной ткани содержится большое количество митохондрий (как правило, более 1000 [1, 2]), ген цитохрома B является многокопийным и его количество определяется типом мышечных волокон, возрастом животного и другими факторами.

В связи с этим, в ряде работ [3, 4] в качестве целевой матрицы для подбора праймеров обосновывается использование однокопийных геномных генов. Тем не менее, во многих других работах, связанных с количественным определением видового состава, в т.ч. ми-

Criteria for meat products authenticity are laid down in the relevant regulations. One of the methods certified in the Russian Federation to confirm the authenticity of meat products is PCR. This method is qualitative; it is based on the use of polymerase chain reaction (PCR), which allows to establish the species composition of the products and to determine the compliance with label claims.

However, in some cases, it is necessary to quantify the specific ingredient to differentiate adulteration of the composition from technically non-removable impurities. However, to develop the quantitative techniques, reference samples are needed, which currently do not exist.

The use of real-time PCR, even in the qualitative mode, allows to estimate the number of determined DNA and, thus, the portion of some meat ingredient in the meat product. Moreover, real-time PCR allows to adjust method sensitivity by the so-called threshold cycles of positive result. This enables the threshold values assignment for the content of various ingredients and the changes to the Russian legislation on the labeling of food products. The laws of Customs Union and EU set out the requirements for labeling concerning allergens "If ingredients causing allergies were not used in the manufacturing of food products, but their presence in such products could not be completely excluded, information of possible presence of such ingredients is placed directly after the information of food product composition". This requirement allows to inform the consumer about the presence of small amounts of specified allergens in the product. By justifying the threshold of technically non-removable impurities, such wording can also be introduced regarding the content of raw meat main types.

To justify the thresholds of contaminants, it is necessary to determine the target analytical matrix, which content in raw meat materials is stable. Most PCR methods use mitochondrial DNA cytochrome B gene as such matrix. Due to the fact that a large number of mitochondria (usually over 1000 [1, 2]) is contained in muscle cells, the cytochrome B gene is a multi-copy one and its number is determined by muscle fiber type, animal age, and other factors.

In this regard, a number of studies [3, 4] demonstrate the use of single-copy genomic genes as the target matrix for the selection of primers. However, in many other works related to the quantification of species composition

кроорганизмов, методом ПЦР широко используются многокопийные гены. [5, 6, 7, 8, 9]

Galliformes (курообразные), к которым относятся большинство сельскохозяйственных видов птиц в ходе эволюции потеряли способность к длительным перелетам. При этом основная динамическая нагрузка у них приходится на ноги. Поэтому в отличие от летающих видов птиц у *Galliformes* (курообразные), грудная мышца содержит меньшее количество «медленных» или выносливых волокон с высоким содержанием митохондрий, данные представлены в таблице. При этом мышцы ног выполняют статическую работу, направленную на удержание и динамическую, используемую при активном перемещении, соответственно эти мышцы содержат значительное количество «медленных» волокон (табл. 1). Это может означать, что эти разные по функционалу группы мышц могут содержать примерно равное количество митохондрий, особенно с учетом современных технологий выращивания птицы.

В связи с этим, **целью этой работы** было обоснование использования многокопийных митохондриальных генов для дальнейшего установления порогового уровня технически неустранимых примесей мяса птицы в готовой мясной продукции.

Объекты и методы

Объектами исследования являлись пробы мяса, выделенные из грудных и бедренных мышц трех образцов тушек кур разных производителей и одного образца тушки утки.

by PCR including microorganisms, multi-copy genes are commonly used [5, 6, 7, 8, 9].

Galliformes, which include most species of poultry, have lost the capacity for long flights in the course of evolution. Thus, the basic dynamic load falls on legs. Therefore, unlike flying bird species, pectoral muscle in *Galliformes* contains fewer “slow” or high endurance fibers with a high content of mitochondria (the data are presented in the table). At the same time, leg muscles perform static work to hold the animal and dynamic work used in active movements, respectively these muscles contain a significant amount of “slow” fibers (Table 1). This means that these functionally different muscles may contain approximately equal number of mitochondria, particularly in the light of modern poultry breeding technologies.

In this context, **the aim of this work** was to justify the use of multi-copy mitochondrial genes for further establishment of the threshold for technically non-removable poultry impurities in the finished meat products.

Objects and methods

The objects of the study were the meat samples derived from the pectoral and hip muscles of 3 chicken carcasses and 1 duck carcass from different manufacturers.

Table 1. Muscle fiber types and their characteristics | Табл. 1. Типы мышечных волокон и их характеристики

Parameters Параметры оценки	Muscle fiber types Тип мышечного волокна		
	FT-fibers (fast) FT-волокна (быстрые)		ST-fibers (slow) ST-волокна (медленные)
	FTG-fibers FTG-волокна	FTO-fibers FTO-волокна	
contraction speed скорость сокращения	high высокая	high высокая	low низкая
contraction force сила сокращения	very high очень большая	high большая	insignificant незначительная
aerobic endurance аэробная выносливость	bad плохая	good хорошая	very good очень хорошая
reactivity реакционная способность	fast быстрая	fast быстрая	slow медленная
fiber diameter диаметр волокна	large большой	medium средний	small малый
a method of producing energy способ получения энергии	glycolysis гликолиз	glycolysis and oxidation гликолиз и окисление	oxidation окисление
content of mitochondria содержание митохондрий	insignificant незначительное	medium среднее	significant значительное
work duration продолжительность работы	short низкая	medium средняя	long высокая
capillarization капилляризация	insignificant незначительная	good to very good от хорошей до очень хорошей	very good очень хорошая
functions выполняемые функции	anaerobic work: activity in submaximal zone, manifestation of maximum power and fast power анаэробная работа: нагрузки в субмаксимальной зоне, проявление максимальной и скоростной силы	long anaerobic activity of medium intensity, fairly intense aerobic activity продолжительная анаэробная нагрузка средней интенсивности, довольно интенсивная аэробная нагрузка	aerobic work, endurance and strength endurance, static work to support and hold аэробная работа, выносливость и силовая работа на опору и удержание

Отбор проб

Образцы мяса измельчали на ножевом гомогенизаторе Retsch GM200. От каждой группы мышц отбирали по 3 навески массой $50 \pm 1,0$ мг.

В работе используется следующая кодировка образцов. Пробы мяса грудной мышцы кур следующие коды: 1-ГМ, 2-ГМ, 3-ГМ; утки- У-ГМ и мяса бедренной мышцы кур - коды образцов 1-БМ, 2-БМ, 3-БМ; утки- У-БМ.

Выделение ДНК

ДНК выделяли набором Сорб-ГМО-Б (ЗАО «Синтол», Россия) согласно инструкции.

Условия проведения ПЦР в реальном времени

Праймеры и зонды, используемые в работе взяты из ГОСТ 31719 — 2012 и МР 4.2.0019 — 11.

Реакционная смесь объёмом 30 мкл содержала 2,5 мкл 10x ПЦР-буфера, 2,5 мкл $MgCl_2$ концентрацией 2,5 мМ, 2,0 мкл dNTP, нуклеотиды в концентрации 25 мМ, SynTaq-полимеразы 2,5 ЕД, праймеры в концентрации 300 нМ и 2 мкл ДНК. Реактивы производства ЗАО «Синтол», Россия.

Режим амплификации: предварительная денатурация — 95 °С, 420 с; отжиг-элонгация — 60 °С, 40 с, денатурация — 95 °С, 15 с, 45 циклов. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе АНК-32 (ЗАО «Синтол», Россия)

Постановку ПЦР проводили, используя десятикратное разведение исходной ДНК.

Статистическая обработка результатов ПЦР проводилась с использованием программного обеспечения, прилагающегося к АНК-32.

Исследование микроструктуры

Исследование микроструктуры проводили в соответствии с ГОСТ 19496-2013 «Мясо и мясные продукты. Метод гистологического исследования». Изучение гистологических препаратов и их фотографирование осуществляли на световом микроскопе «AxioImaiger A1» (Carl Zeiss, Германия) с помощью подключенной видеокамеры «AxioCam MRc 5». Обработку изображений производили с применением компьютерной системы анализа изображений «AxioVision 4.7.1.0», адаптированной для гистологических исследований.

Результаты и обсуждение

Для оценки пригодности метода с использованием видоспецифических праймеров к гену цитохрома Б для количественной оценки содержания ДНК была поставлена серия ее десятикратных разведений (Рис. 1)

Статистическая обработка полученных данных приведена на рис. 2.

Из рис. 1-2 видно, что кривые амплификации выходят с равным интервалом, характерным для десятикратных разведений, коэффициент корреляции составляет более 99,9 %, что является приемлемым значением для построения калибровочной кривой.

Sample collection

Meat samples were ground with Retsch GM200 blade homogenizer. Three samples of 50 ± 1.0 mg were selected from each muscle.

In the following coding of samples was used: chicken pectoral muscle samples, 1-PM, 2-PM, 3-PM; duck pectoral muscle sample, D-PM; chicken hip muscle samples, 1-HM, 2-HM, 3-HM; duck hip muscle sample, D-HM.

Isolation of DNA

DNA was isolated by Sorb-GMO-B kit (Syntol CJSC, Russia) according to the instructions.

Conditions for real-time PCR

Primers and probes used in this work were taken from GOST 31719-2012 and MP 4.2.0019-11.

The reaction mixture (30 ul) contained 2.5 ul of 10X PCR buffer, 2.5 ul of 2.5 mM $MgCl_2$, 2.0 ul of dNTP, nucleotides at a concentration of 25 mM, 2.5 U of SynTaq-polymerase, primers at a concentration of 300 nM, and 2 ul of DNA. The reagents are manufactured by Syntol CJSC, Russia.

Amplification mode: pre-denaturation — 95 °С, 420 seconds; annealing-elongation — 60 °С, 40 seconds; denaturation — 95 °С, 15 seconds, 45 cycles. Real-time PCR was performed on a ANK-32 thermocycler (Syntol CJSC, Russia).

PCR amplification was performed using a tenfold dilution of the original DNA.

Statistical analysis of the PCR results was performed using the software supplied with ANK-32 thermocycler.

Microstructure research

Microstructure research was performed in accordance with GOST 19496-2013 “Meat and meat products. Histological study method”. The study of histological slides and the photographs were performed on AxioImaiger A1 light microscope (Carl Zeiss, Germany) using the connected AxioCam MRc 5 camera. Image processing was performed using AxioVision 4.7.1.0 computer image analysis system adapted for histological studies.

Results and discussion

To assess suitability of the method using species-specific primers for cytochrome B gene in order to quantify DNA content, serial tenfold dilutions of DNA were performed (Figure 1).

Statistical analysis of the data is shown in Figure 2.

Figures 1-2 show that the amplification curves are located at regular intervals, which are characteristic of tenfold dilutions. Correlation coefficient is more than 99.9%, which is an acceptable value for the calibration curve.

Дальнейшие измерения проводились в указанном диапазоне концентраций ДНК. Кривые амплификации образцов мяса кур и утки с использованием митохондриальных праймеров представлены на рис. 3–6.

Как видно из рис. 3–6 расхождения в кривых амплификации не превышают 1 порогового цикла, при этом в образцах 1 и 3 митохондриальной ДНК было немного больше в бедренных мышцах, в то время как в образцах 2 и 4 наоборот, ее было немного больше в грудных мышцах.

Сводные данные полученных значений порогового цикла изложены в табл. 2.

Из табл. 2 видно что среднее значение отклонения для образцов с положительным значением ΔC_t составляет 0,41; а для образцов с отрицательным значением ΔC_t составляет 0,49 что вполне укладывается в параметры

Further measurements were carried out at specified DNA concentration range. Amplification curves for samples of chicken and duck meat using mitochondrial primers are shown in Figures 3–6.

Figures 3–6 show that deviations in amplification curves do not exceed 1 threshold cycle. The mitochondrial DNA content for samples 1 and 3 was slightly higher in hip muscles while in samples 2 and 4, its content was slightly higher in pectoral muscles.

Summarized data for obtained threshold cycle values are shown in Table 2.

Table 2 shows that for samples with a positive ΔC_t value mean deviation is 0.41 and for samples with a negative ΔC_t value mean deviation is 0.49, which is well within the parameters of PCR method reproducibility. Based on these

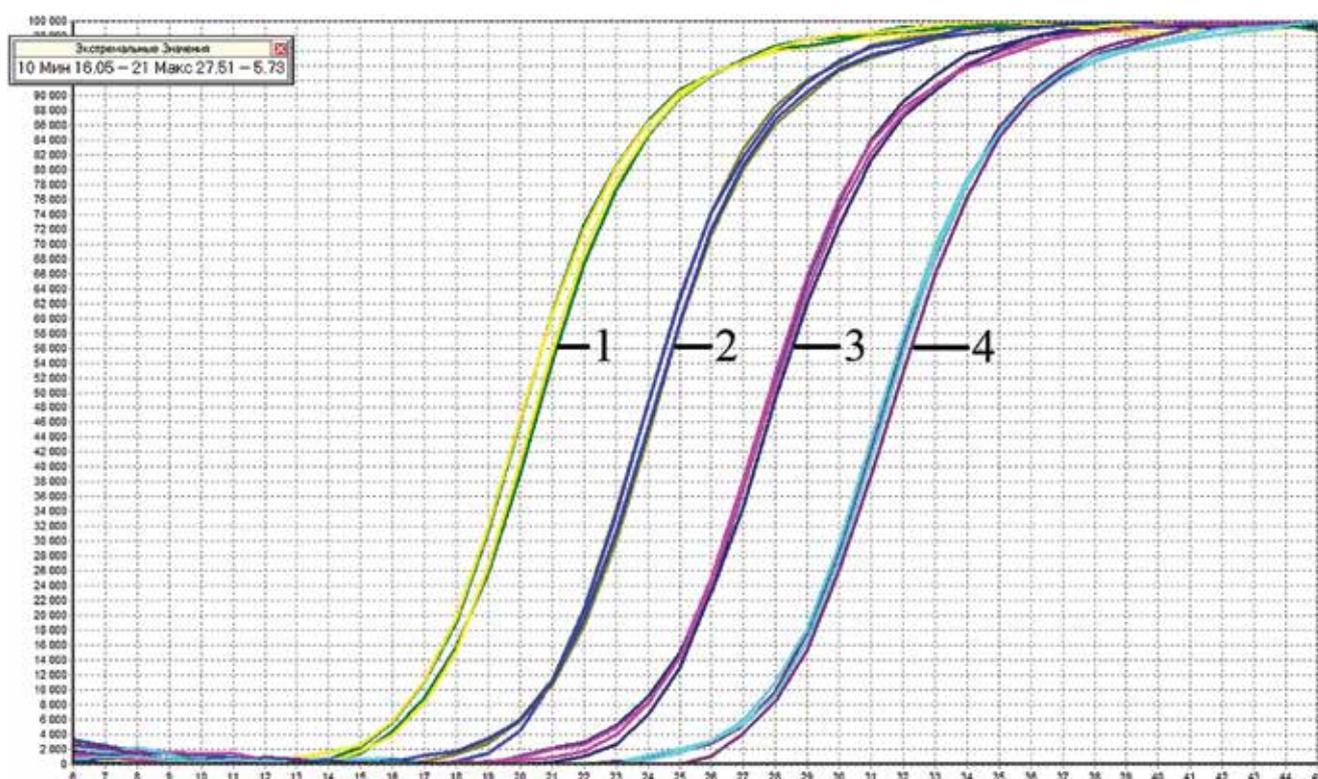


Figure 1. Amplification curves for tenfold dilutions of chicken DNA (1 — Chicken DNA, original, 2 — Chicken DNA, 10^{-1} dilution, 3 — Chicken DNA, 10^{-2} dilution, 4 — Chicken DNA, 10^{-3} dilution)

Рис. 1. Кривые амплификации десятикратных разведений ДНК кур (1 — ДНК Курицы исходная, 2 — ДНК Курицы, разведение 10^{-1} , 3 — ДНК Курицы, разведение 10^{-2} , 4 — ДНК Курицы, разведение 10^{-3})

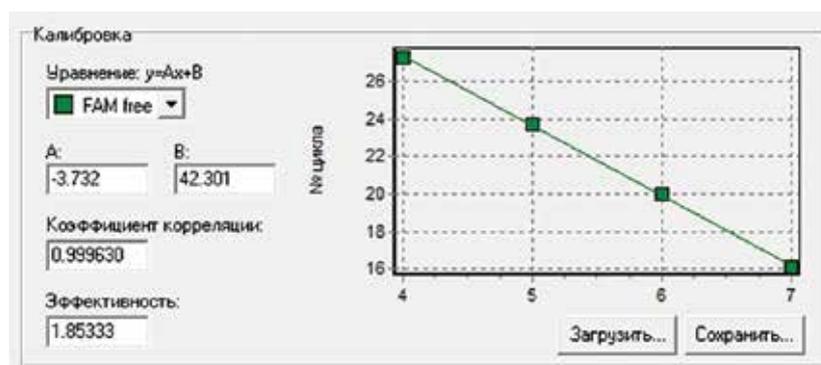


Figure 2. Calibration curve plotted according to C_t of chicken DNA tenfold dilutions.

Рис. 2. Калибровочная кривая, построенная по данным C_t десятикратных разведений ДНК кур.

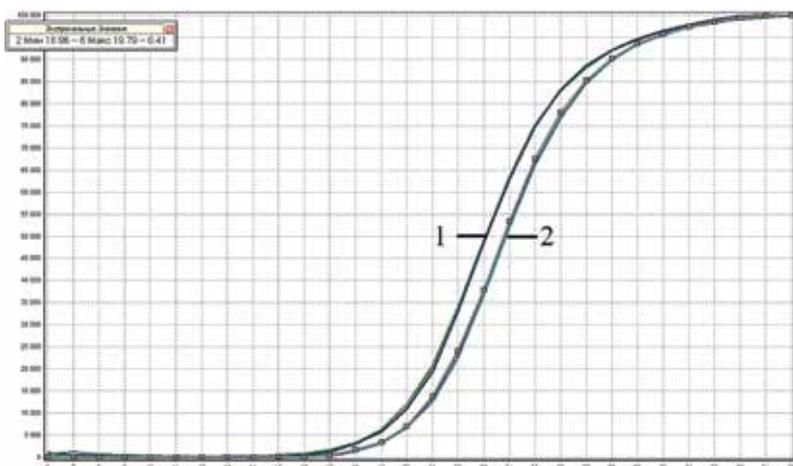


Figure 3. Amplification curves for DNA of 1-PM and 1-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)
 1 — 1-HM
 2 — 1-PM
 Рис. 3 Кривые амплификации ДНК образцов 1-ГМ и 1-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)
 1 — 1-БМ
 2 — 1-ГМ

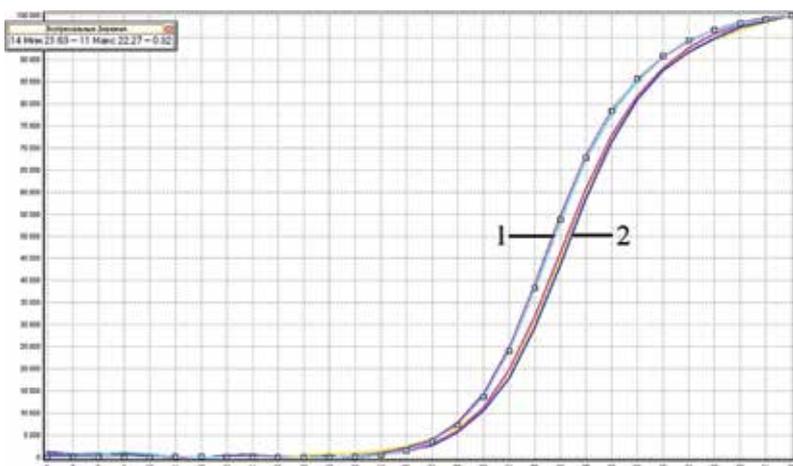


Figure 4. Amplification curves for DNA of 2-PM and 2-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)
 1 — 2-PM
 2 — 2-HM
 Рис. 4 Кривые амплификации ДНК образцов 2-ГМ и 2-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)
 1 — 2-ГМ
 2 — 2-БМ

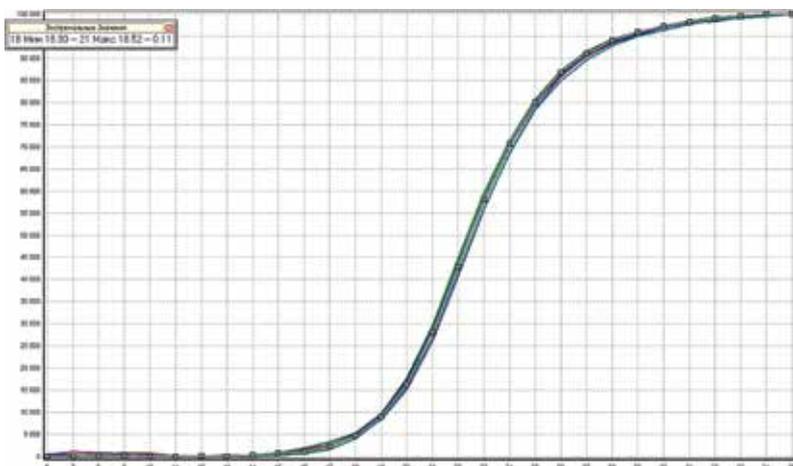


Figure 5. Amplification curves for DNA of 3-PM and 3-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)
 Рис. 5. Кривые амплификации ДНК образцов 3-ГМ и 3-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)

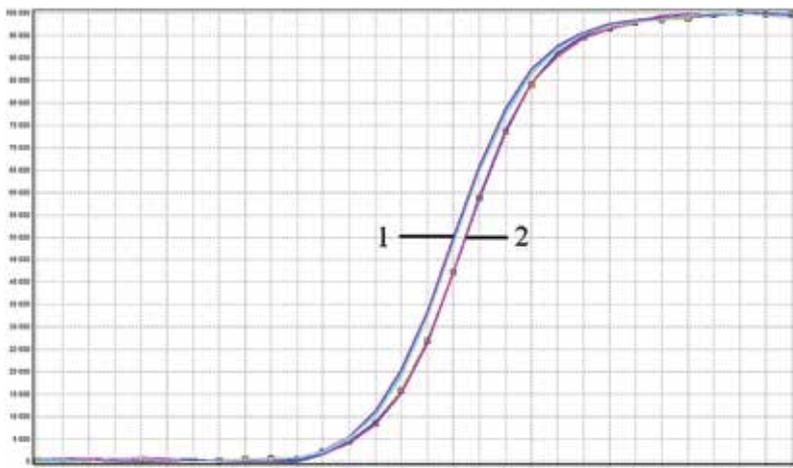


Figure 6. Amplification curves for DNA of D-PM and D-HM samples using mitochondrial primers (in triplicate)
 1 — D-PM
 2 — D-HM
 Рис. 6 Кривые амплификации ДНК образцов У-ГМ и У-БМ с использованием митохондриальных праймеров (трехкратная повторность)
 1 — У-ГМ
 2 — У-БМ

Table 2. The values of threshold cycle Ct for amplified samples using mitochondrial primers

Табл. 2. Значения порогового цикла Ct амплифицированных образцов с использованием митохондриальных праймеров

Samples Образцы	The values of threshold cycle Ct Значения порогового цикла Ct			Mean Среднее значение	ΔCt
	Increment sample 1 Точечная проба 1	Increment sample 2 Точечная проба 2	Increment sample 3 Точечная проба 3		
1-PM	19.73	19.79	19.70	19.74	+ 0.7
1-HM	18.96	19.06	19.09	19.04	
2-PM	21.66	21.63	21.70	21.64	- 0.53
2-HM	22.14	22.27	22.10	22.17	
3-PM	18.52	18.46	18.41	18.47	+ 0.13
3-HM	18.30	18.37	18.34	18.34	
D-PM	18.58	18.60	18.62	18.60	- 0.45
D-HM	18.24	18.03	18.19	18.15	

тры воспроизводимости ПЦР метода. Исходя из приведенных данных, можно сделать вывод, что в грудных и бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц содержится равное количество митохондрий, что подтверждает наше изначальное предположение.

Геномная ДНК содержится в ядрах клеток, количество которых также зависит от типа ткани. В мышечных волокнах плотность ядер примерно одинаковая, в то время как в соединительной она может быть разной. При этом, в рыхлой волокнистой соединительной ткани плотность клеток выше, чем в мышечной. Опорные мышцы содержат значительно больше соединительной ткани, чем динамические мышцы, соответственно и плотность ядер клеток будет выше рис_.

Площадь, занимаемая ядрами, относительно площади всего среза в бедренной группе мышц составляет 1,9%, в то время как в грудной группе мышц — 1,5%.

Кривые амплификации образцов мяса кур и утки с использованием геномных праймеров представлены на рис. 7–10.

Как видно из рис. 7–10 расхождения в кривых амплификации в отдельных образцах превышают 1 пороговый цикл, при этом максимальное различие отмечено в образцах мышечной ткани утки.

Сводные данные полученных значений порогового цикла изложены в табл. 3

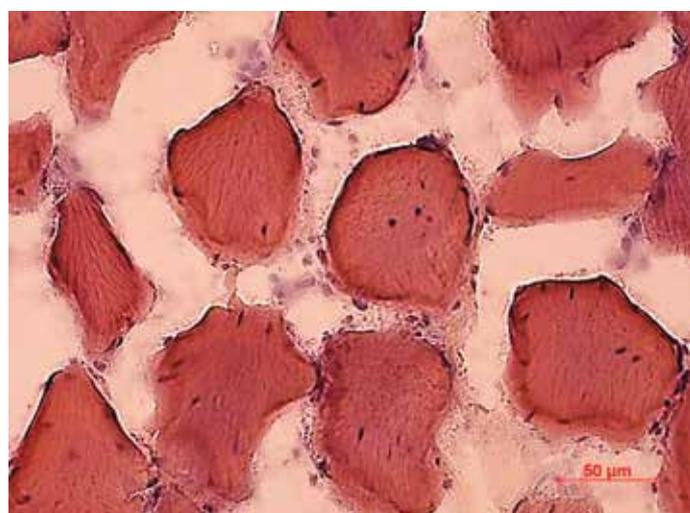


Figure 7. Microstructure of hip muscle tissue sample (x40)
Рис. 7. Микроструктура образца мышечной ткани бедра (об. x40)

data, it can be concluded that poultry pectoral and hip muscles contain equal number of mitochondria. It confirms our initial assumption.

Genomic DNA is contained in the nuclei of cells, the number of which is also dependent on tissue type. In muscle fibers, the nuclei density is approximately equal, while in connective tissue, it can be different. Thus, in fibrous connective tissue, cell density is higher than in muscles. Supporting muscles contain significantly higher amount of connective tissue compared to dynamic muscles, respectively, the density of nuclei in such muscles is higher.

Relative to the total area of cut, the area occupied by the nuclei in hip muscle is 1.9%, while in pectoral muscle it is 1.5%.

Amplification curves for chicken and duck meat samples using genomic primers are shown in Figures 7–10.

Figures 7-10 show that deviations in amplification curves for individual samples exceed 1 threshold cycle. The maximum difference is noted for the samples of duck muscle tissue.

Summarized data for obtained threshold cycle values are shown in Table 3.

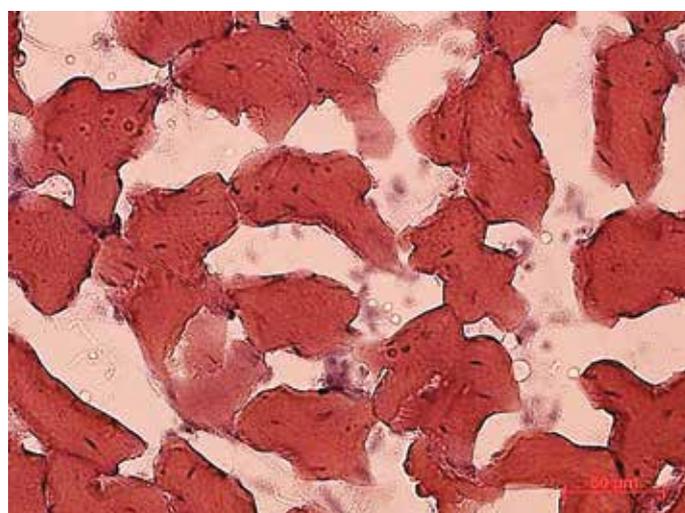


Figure 8. Microstructure of pectoral muscle tissue sample (x40)
Рис. 8. Микроструктура образца мышечной ткани грудки (об. x40)

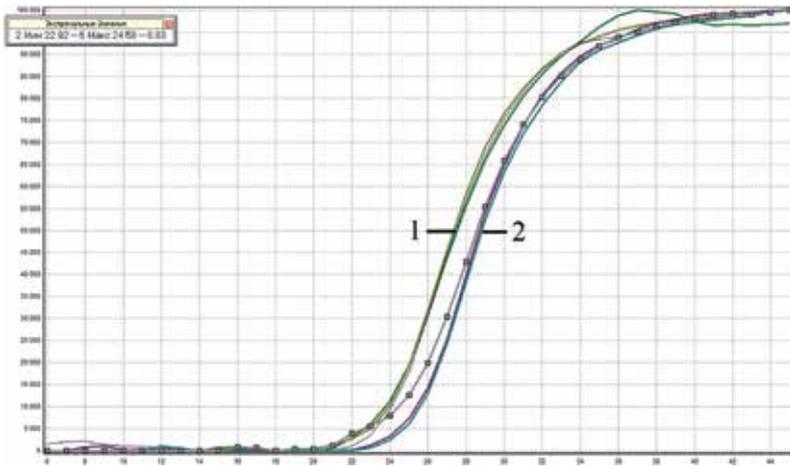


Figure 9. Amplification curves for DNA of 1-PM and 1-HM samples using genomic primers (in triplicate)

1 — 1-НМ

2 — 1-РМ

Рис. 9. Кривые амплификации ДНК образцов 1-ГМ и 1-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

1 — 1-БМ

2 — 1-ГМ

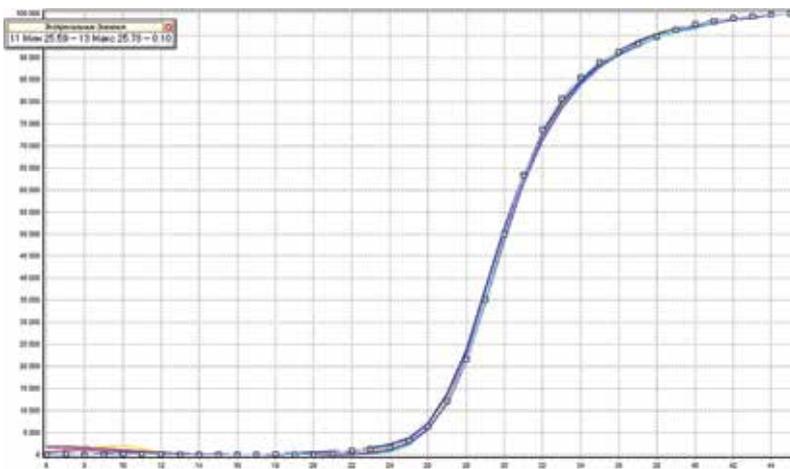


Figure 10. Amplification curves for DNA of 2-PM and 2-HM samples using genomic primers (in triplicate)

Рис. 10. Кривые амплификации ДНК образцов 2-ГМ и 2-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

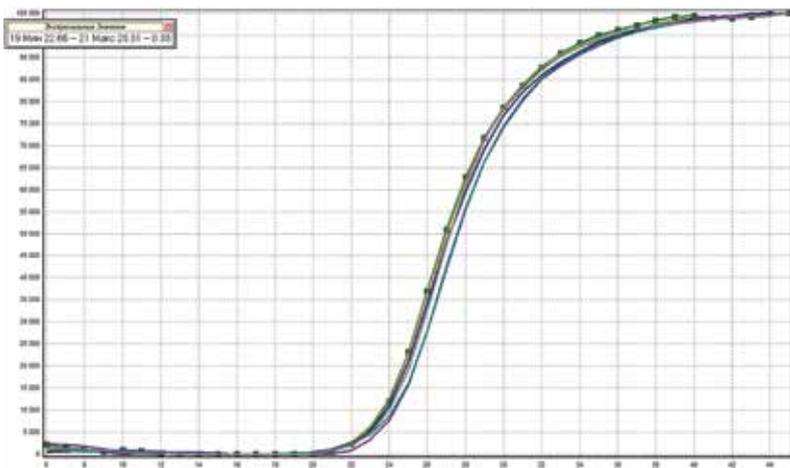


Figure 11. Amplification curves for DNA of 3-PM and 3-HM samples using genomic primers (in triplicate)

1 — 3 РМ

2 — 3 НМ

Рис. 11. Кривые амплификации ДНК образцов 3-ГМ и 3-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

1 — 3 ГМ

2 — 3 БМ

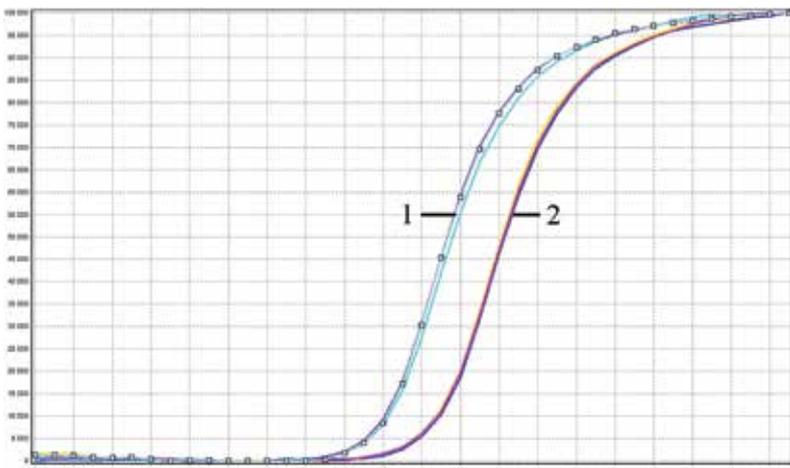


Figure 12. Amplification curves for DNA of D-PM and D-HM samples using genomic primers (in triplicate)

1 — D-РМ

2 — D-НМ

Рис. 12. Кривые амплификации ДНК образцов У-ГМ и У-БМ с использованием геномных праймеров (трехкратная повторность)

1 — У-ГМ

2 — У-БМ

Table 3. The values of threshold cycle Ct for amplified samples using genomic primers

Табл.3. Значения порогового цикла Ct амплифицированных образцов с использованием геномных праймеров

Samples Образцы	The values of threshold cycle Ct Значения порогового цикла Ct				ΔCt
	Increment sample 1 Точечная проба 1	Increment sample 2 Точечная проба 2	Increment sample 3 Точечная проба 3	Mean Среднее значение	
1-PM	24.50	24.58	23.86	24.31	+ 1.3
1-НМ	22.92	22.99	23.11	23.01	
2-PM	25.70	25.59	25.68	25.66	- 0.11
2-НМ	25.78	25.76	25.78	25.77	
3-PM	23.31	23.29	23.00	23.20	+ 0.49
3-НМ	22.70	22.66	22.78	22.71	
D-PM	23.35	23.16	23.21	23.24	- 2.92
D-НМ	25.90	26.03	25.94	25.96	

Из табл. 3 видно среднее значение отклонения для образцов с положительным значением ΔCt составляет 0,89; а для образцов с отрицательным значением ΔCt составляет 1,51 что свидетельствует о нестабильности данной матрицы. Исходя из приведенных данных, можно сделать вывод, что не во всех случаях [3, 4] использование однокопийных генов в качестве матрицы для количественного анализа позволяет получить точный результат.

Следует отметить, что в работе Ballin N.Z. [4] изучалось соотношение количества митохондриальной и геномной ДНК в целях оптимизации метода количественного учёта соотношения мясных ингредиентов в сырье. В данной работе, в частности, было проведено сравнение количества митохондриальной ДНК различных пород свиней, что показало незначительную разницу в результатах амплификации. Однако как следует из полученных нами данных по мясу птицы, соотношение митохондриальной и геномной ДНК может варьироваться в различных тканях организма, что также следует учитывать при подобном походе. При этом, количество митохондриальной ДНК менее варьирует по тканям, в отличие от геномной ДНК, что соответствует нашим полученным результатам.

Выводы

1. В грудных и бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц содержится равное количество митохондрий.
2. Содержание геномной ДНК в равных навесках проб бедренных мышцах сельскохозяйственных птиц нестабильно.
3. Полученные в ходе проведения данной работы результаты позволяют сделать заключение, что для обоснования уровня технически неустраняемой примеси готовой мясной продукции мясом кур необходимо использовать праймеры, специфические к их митохондриальной ДНК.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность с.н.с. Экспериментальной клиники-лаборатории биологически-активных веществ животного происхождения Пчёлкиной Виктории Викторовне за проведённые гистологические исследования.

Table 3 shows that for samples with a positive ΔCt value mean deviation is 0.89 and for samples with a negative ΔCt value mean deviation is 1.51, which indicates the instability of this matrix. Based on the data given, it can be concluded that the use of single-copy genes as a matrix for quantitative analysis allows obtaining accurate results only in some cases [3, 4].

It should be noted that Ballin N.Z. [4] studied the ratio of the amount of mitochondrial and genomic DNA in order to optimize the method of quantification of meat ingredients ratio in raw materials. In this study, in particular, a comparison was made of the amount of mitochondrial DNA for various pig breeds, which showed a slight difference in the results of amplification. However, data on poultry meat show that the ratio of mitochondrial and genomic DNA in different tissues may vary, which should also be taken into account in such approach. At the same time, the amount of mitochondrial DNA in different tissues is less variable, in contrast to genomic DNA, which corresponds to our results.

Conclusion

1. Pectoral and hip muscles of poultry contain equal amount of mitochondria.
2. The content of genomic DNA in equal samples of poultry hip muscles is unstable.
3. The results obtained in this work allow to conclude that, to justify the level of technically non-removable chicken impurities in finished meat products, primers must be used, which are specific for their mitochondrial DNA.

Acknowledgment

The authors express gratitude to the senior research scientist of Experimental clinic-laboratory of biologically active substances of animal origin, Pchelkina Victoria Viktorovna, for histological studies.

REFERENCES | БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Porter C, Wall BT. Skeletal muscle mitochondrial function: is it quality or quantity that makes the difference in insulin resistance. *The Journal of Physiology* 2012 Dec 23; 590(23): 5935–5936.
2. Cole LW. The Evolution of Per-cell Organelle Number. *Frontiers in cell and developmental biology* 2016 Aug 18; 4: 85.
3. Cai Y, Li X, Lv R, et al.. Quantitative Analysis of Pork and Chicken Products by Droplet Digital PCR. *BioMed Research International* 2014 Aug 27; Volume 2014, Article ID 810209, 6 pages.
4. Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. PCR amplification of repetitive sequences as a possible approach in relative species quantification. *Meat Science* 2012; 90: 438–443.
5. Lakzadeh L, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS et al.. Application of PCR and SYBR Green QRTi-PCR Assays for the Identification and Quantification of Chicken Meat Under Different Cooking Conditions. *Food Biotechnology* 2013; 27:249–260.
6. Marchis D, Benedetto A, Amato G et al.. A quantitative real time polymerase chain reaction approach for estimating processed animal proteins in feed: preliminary data. *Italian Journal of Food Safety* 2013; 2:e4: 7–9.
7. Pegels N, González I, López-Calleja I et al. Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poultry Science* 2012; 91 :1709–1719.
8. Martín B, Jofré A, Garriga M et al.. Rapid Quantitative Detection of *Lactobacillus sakei* in Meat and Fermented Sausages by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2006 Sept;72(9): 6040–6048.
9. Ghovvati S., Nassiri M.R, Mirhoseini S.Z. et al., Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 2009; 20: 696–699.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Минаев Михаил Юрьевич — кандидат технических наук, руководитель ПЦР направления, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова

109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26

Тел.: +7-495-676-60-11

E-mail: mminaev@inbox.ru

Солодовникова Галина Ивановна — старший научный сотрудник ПЦР направления, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова

109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26

Тел.: +7-495-676-60-11

E-mail: 6766011@inbox.ru

Курбаков Константин Андреевич — младший научный сотрудник ПЦР направления, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова

109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26

Тел.: +7-495-676-60-11

E-mail: homo_ludens@vniimp.ru

Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.02.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Minaev Mikhail Yurievich — candidate of technical sciences, a head of the Molecular diagnostic division, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel: +7-495-676-60-11

E-mail: mminaev@inbox.ru

Solodovnikova Galina Ivanovna — senior research scientist of the Molecular diagnostic division, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel: +7-495-676-60-11

E-mail: 6766011@inbox.ru

Kurbakov Konstantine Andreevich — junior research scientist of the Molecular diagnostic division, The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel: +7-495-676-60-11

e-mail: homo_ludens@vniimp.ru

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 08.02.2017