

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-2-80-93>

Поступила 29.03.2022

Поступила после рецензирования 20.04.2022

Принята в печать 29.04.2022

© Фомина Т. А., Кулешова М. Г., Минаев М. Ю., Коноров Е. А., 2022



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ РЫБЫ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ (NGS)

Фомина Т. А.^{1,2}, Кулешова М. Г.^{1,2}, Минаев М. Ю.*¹, Коноров Е. А.¹

¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Россия, Москва

² Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры, Россия, Москва

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:
видовой состав, идентификация рыб, ДНК, молекулярная диагностика, секвенирование NGS, ПЦР

АННОТАЦИЯ

Законы о маркировке рыбы и рыбной продукции, требующие указывать информацию о видовой принадлежности рыбы, есть во многих странах мира. Данные правила обусловлены высоким ростом количества случаев экономического мошенничества в области производства и оборота рыбных продуктов. Распространенными способами мошенничества являются подмена и неправильная маркировка продукта, что подтверждается многочисленными исследованиями. Анализ научных работ показал, что применение неправильной маркировки при производстве рыбных продуктов в разных странах встречается в 30–70% случаев. Для их предотвращения имеющегося законодательства о прослеживаемости пищевых продуктов недостаточно, что указывает на необходимость принятия строгих мер контроля, обеспечивающих эффективную видовую идентификацию рыбы и рыбопродуктов. В настоящее время для идентификации их видовой принадлежности используют различные лабораторные тесты, главным образом основанные на анализе уникальных профилей ДНК, которые обнаружены у различных видов. В данной работе представлен метод определения видовой принадлежности рыб с использованием секвенирования нового поколения (NGS). Технология секвенирования NGS является передовой в области контроля качества рыбной продукции, особенно для идентификации видов рыб в многокомпонентной продукции, в которой помимо целевой ДНК присутствуют и фрагменты ДНК других видов. Секвенирование NGS проводили на платформе Ion Torrent Ion GeneStudio S5 System, были проанализированы двадцать образцов, 17 коммерческих образцов и 3 приготовленных опытных образца, состоящих их смеси двух и более видов. Были подобраны и подготовлены универсальные праймеры, способные амплифицировать фрагмент 16S rRNA промысловых видов рыб. В целом в ходе анализа была идентифицирована ДНК 11 семейств, 15 родов и 16 видов. Полученный результат секвенирования NGS 17 коммерческих образцов подтверждал результаты идентификации другими молекулярно-диагностическими методами, была выявлена неправильная маркировка в 4 образцах. В 3 опытных образцах были идентифицированы все виды рыб, входящих в их состав. Была произведена оценка возможных причин замены рыбы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FGUS-2019–0001 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

БЛАГОДАРНОСТЬ: Авторы выражают благодарность сотрудникам испытательной референс-лаборатории Национального центра безопасности продукции водного промысла и аквакультуры за предоставление материально-технической базы для выполнения испытаний, описанных в данной работе.

Received 29.03.2022

Accepted in revised 20.04.2022

Accepted for publication 29.04.2022

© Fomina T. A., Kuleshova M. G., Minaev M. Yu., Konorov E. A., 2022

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

IDENTIFICATION OF FISH SPECIES USING THE NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) TECHNOLOGY

Tatyana A. Fomina^{1,2}, Mariya G. Kuleshova^{1,2}, Mihail Yu. Minaev^{1*}, Evgeniy A. Konorov¹

¹ V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

² National Centre for Safety of Aquatic Fisheries Products and Aquaculture, Moscow, Russia

KEY WORDS:

species composition, fish identification, DNA, molecular diagnostics, next generation sequencing (NGS), PCR

ABSTRACT

The laws relating to fish and fishery product labeling that require indication of the information about fish species exist in many world countries. These rules are conditioned by a significant growth in the number of the economic fraud cases in the field of production and trade of fishery products. The widespread ways of fraud are replacement and mislabeling of a product as confirmed by many studies. Analysis of scientific works shows that mislabeling in fishery product manufacture occurs in 30–70% of cases in different countries. The existing legislation about food traceability is insufficient for their prevention, which suggests a necessity of taking strict control measures ensuring effective species identification of fish and fishery products. At present, various laboratory tests are used for their species identification. They are based, mainly, on analysis of unique DNA profiles found in different species. In this work, we present the method for detection of fish species using next generation sequencing (NGS). NGS is an advanced technology in the field of quality control of fishery products, especially for fish species identification

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Фомина, Т. А., Кулешова, М. Г., Минаев, М. Ю., Коноров, Е. А. (2022). Идентификация видов рыбы с помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS). *Пищевые системы*, 5(2), 80–93. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-2-80-93>

FOR CITATION: Fomina, T. A., Kuleshova, M. G., Minaev, M. Yu., Konorov, E. A. (2022). Identification of fish species using the next generation sequencing (NGS) technology. *Food systems*, 5(2), 80–93. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-2-80-93>

in multicomponent products, which contain DNA fragments of other species besides the target DNA. NGS was carried out on the platform Ion Torrent Ion GeneStudio S5 System. Twenty samples were analyzed: 17 commercial samples and three prepared experimental samples consisted of the mixture of two and more species. The universal primers, which were able to amplify the fragment 16S rRNA of the commercial fish species, were selected and prepared. In general, DNA of 11 families, 15 genera and 16 species was identified in the course of the analysis. The obtained result of NGS of 17 commercial samples confirmed the results of identification by other molecular diagnostic methods. Mislabeling was revealed in four samples. In three samples, all fish species present in the composition were identified. Possible reasons for fish replacement were assessed.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FGUS-2019–0001 of the state assignment of the V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors thank the testing reference laboratory of the National Centre for Safety of Aquatic Fisheries Products and Aquaculture for provision of the material and technical base to perform investigations described in this work.

1. Введение

В настоящее время потребители уделяют все больше внимания вопросам качества и безопасности пищевых продуктов. Научная коммуникация через средства массовой информации увеличивает знания потребителей и в то же время приводит к подозрительному отношению к науке и, в частности, биотехнологиям [1].

Потребители восприимчивы к любым формам изменения пищевых продуктов, которые могут произойти во время стандартных производственных процессов, чаще всего они обращают внимание на пищевые ингредиенты в случае наличия диетических требований к питанию или медицинских показаний. В силу этих причин потребитель становится все более и более требовательным к качеству пищевых продуктов, в частности к прослеживаемости и использованию подробных этикеток продуктов [1].

Разные государства имеют свои национальные руководящие принципы производства и сохранения пищевых продуктов, а также безопасного их употребления. Так, например, международная сеть органов власти по безопасности пищевых продуктов (ИНФОСАН), которая была создана Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в сотрудничестве с Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО) в целях содействия обмену информацией о безопасности пищевых продуктов и для совершенствования сотрудничества между органами по безопасности пищевых продуктов в 2006 году представила информационную записку, в которой было отмечено, что пищевые аллергии являются важными проблемами здравоохранения [2,3]. В данной информационной записке были представлены ответы на самые важные вопросы, в том числе и на вопрос «Какие пищевые продукты могут вызывать аллергию?». Комитет по маркировке пищевых продуктов Комиссии «Кодекс Алиментариус» (Международная комиссия ФАО/ВОЗ по внедрению кодекса стандартов и правил по пищевым продуктам) в разделе 4.2.1.4 Общих стандартов по маркировке расфасованных продуктов питания [4] привел перечень аллергенных пищевых продуктов и ингредиентов. Они известны тем, что могут вызвать наиболее острую аллергическую реакцию и привести к многочисленным случаям возникновения пищевой гиперчувствительности, поэтому всегда должны быть указаны на маркировке [3]. В этот список входит рыба и продукты ее переработки.

Европейский союз установил законы о маркировке рыбы и рыбной продукции, требующие указывать информацию отслеживания, такую как определение вида, происхождения рыбы и способ производства [5,6], в целях предотвращения случаев экономического мошенничества. В частности, Постановление Совета (ЕС) № 1224/2009 от 20 ноября 2009 года [7] вводит систему контроля за соблюдением правил общей рыбохозяйственной политики. Прослеживаемость и контроль всей производственной и сбытовой цепочки регулируется Регламентом (ЕС) № 178/2002 Европейского

Парламента и Совета от 28 января 2002 года [8]. Интересы потребителей защищены Регламентом (ЕС) № 1379/2013 Европейского Парламента и Совета от 11 декабря 2013 года, который устанавливает подробные правила информирования потребителей о продуктах рыболовства и аквакультуры, а также обязывает компетентные национальные органы, ответственные за мониторинг и обеспечивающие выполнение обязательств данного Регламента, использовать в полном объеме имеющиеся научно-технические знания. Применение этих знаний предполагает в том числе анализ видовой принадлежности рыбы по ДНК, чтобы вынудить участников хозяйственной деятельности отказаться от ложной маркировки уловов [9].

Как показывает анализ ряда научных работ, проблемы неправильной маркировки освещаются достаточно давно, так, например, Marko P. B. с коллегами в 2004 году опубликовал статью, в которой представил результаты молекулярно-генетического анализа рыбы, продаваемой в Соединенных Штатах как «красный люциан» (законное общее название, обозначенное управлением по контролю за продуктами и лекарствами США), принадлежит к другому виду — *Lutjanus campechanus*. Неправильная маркировка была выявлена в 77% случаях [10]. Неправильная маркировка в такой степени не только обманывает потребителей, но и может негативно сказаться на их здоровье [11].

M. A. Pardo с коллегами, был проведен обзор опубликованных за пять лет научных отчетов, в которых рассматривались случаи неправильной маркировки рыбы и рыбных продуктов. Всего было проведено 51 рецензирование. Суммарно были проанализированы 4500 образцов, исследованных с помощью ДНК-методов по всему миру. Средний процент зарегистрированных нарушений составлял 30% [12].

В работе von der Heyden.S. и соавторов отражены результаты исследований 178 образцов самых популярных на южноафриканском рынке видов рыб с использованием секвенирования мтДНК 16S рРНК. Согласно полученным результатам, около половины всех образцов имеют неправильную маркировку. Самыми проблемными оказались образцы филе рыбы *Kob* (*Argyrosomus japonicus*), 84% данных образцов принадлежали к другим видам включая скумбрию, горбуна и австралийскую сериолеллу [13].

Наличие неправильной маркировки было выявлено многочисленными исследованиями. Считается, что это не только является экономической проблемой, но и способствует сокращению рыбного промысла, чрезмерной эксплуатации рыбных запасов и препятствует восстановлению рыбных популяций и экосистем. Это связано с тем, что ложная маркировка часто скрывает незаконный, несообщаемый и нерегулируемый промысел, на долю которого приходится примерно пятая часть мирового улова, и таким образом создает серьезную угрозу устойчивому рыболовству [14].

David J. Agnew с коллегами анализировали ситуацию с незаконным и несообщаемым промыслом в 54 странах

и подсчитали, что общая стоимость потерь от незаконного и несообщаемого рыболовства во всем мире достигает порядка 10–23,5 миллиардов долларов, что составляет от 11 до 26 миллионов тонн.

Развивающиеся страны в наибольшей степени подвержены риску распространения незаконного рыболовства, так, например, общий расчетный улов в Западной Африке на 40% превышает заявленный. Такие уровни эксплуатации серьезно затрудняют устойчивое управление морскими экосистемами [15].

Несмотря на то, что в некоторых районах были достигнуты определенные успехи в снижении уровня незаконного рыболовства, эти события также требуют международного внимания.

Спрос на надежные системы отслеживания рыбных продуктов привел к появлению различных аналитических подходов к этой проблеме. На данный момент контроль качества осуществляется с помощью различных лабораторных тестов, главным образом основанных на анализе уникальных профилей белка или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), обнаруженных у различных видов рыб [16,17].

В данной работе будет представлен современный метод определения видовой принадлежности рыб с использованием секвенирования нового поколения (NGS).

2. Материалы и методы

2.1. Сущность метода

Для определения видовой принадлежности рыб с применением секвенирования нового поколения была разработана методология с использованием подхода секвенирования целевого анализа, или секвенирование ампликонов-мишеней (Targeted analysis sequencing, TAS). Данный подход ориентирован на ампликоны и специфические гены [18].

В основе методологии лежит двухэтапный процесс ПЦР, который позволяет решить основную задачу — одновременное исследование множества проб путем анализа гена с определенным уровнем дивергенции.

На первом этапе проводят традиционную ПЦР с парой праймеров, фланкирующей участок целевой области гена, вследствие чего осуществляется накопление копий определенной нуклеотидной последовательности генома. Затем приступают ко второму этапу дополнительной ПЦР, в ходе которой прикрепляют известную метку (штрихкод) для идентификации образцов в пуле библиотеки ампликонов.

Двухэтапный процесс ПЦР приводит к меченым ампликонам, которые готовы к непосредственному секвенированию с использованием платформы следующего поколения. Для наших целей используется ионное полупроводниковое секвенирование, которое основано на регистрации изменений вследствие обнаружения ионов водорода, выделяющихся при полимеризации ДНК. Микроэлемент (сенсорный чип), содержащий цепочку ДНК-библиотек (шаблон), подлежащих секвенированию, заполняется дезоксирибонуклеотидтрифосфатом (dNTP) одного вида, и, если введенный нуклеотид комплементарен к ведущему нуклеотиду шаблона, он включается в растущую комплементарную нить, что вызывает высвобождение иона водорода. Выделяющиеся в этой реакции протоны изменяют поверхностный заряд покрывающего сенсорный чип pH-чувствительного слоя, что влияет на проводимость расположенной ниже сенсорной зоны. Если гомополимерные повторы присутствуют в последовательности шаблона, несколько нуклеотидов будут включены в один цикл. Это приводит к соответствующему количеству высвобожденных водородов и пропорционально более высокому электронному сигналу [19, 20].

Полученный «интересующий» сиквенс амплифицированного фрагмента ДНК используется для определения принадлежности анализируемого образца к определенному таксону (вид, род) путем сравнения сиквенса с известными последовательностями в уже существующей классификации (алгоритм BLAST).

2.2. Дизайн праймеров

С целью применения технологии NGS для идентификации видов рыб, основанной на дивергенции последовательности, были подобраны универсальные праймеры для амплификации последовательностей участка митохондриальной ДНК в области гена 16S рибосомальной РНК, праймеры первого раунда представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Праймеры первого раунда

Table 1. First round primers

Олигонуклеотидные праймеры первого раунда амплификации (5'→3')
Forward GCCTCTGCCCAATGGTATAAGACGAGAAGACCCT
Reverse AAGAAGTGGTTGGAAGCTCTCAATTGCGCTGTATCCCT

Подбор праймеров целевой области гена, фланкирующей участок, осуществляли с помощью программы CLC Sequence Viewer 7 и Primer-BLAST.

Для создания дизайна пары праймеров второго раунда использовали программу для разработки полного набора праймеров для слияния штрихкодов Ion Xpress. Одновременно нами были исследованы 20 проб, соответственно для двунаправленного секвенирования были синтезированы 40 пар праймеров, каждая мишень была амплифицирована в двух отдельных реакциях ПЦР с использованием в качестве праймеров ПАРЫ 1 и ПАРЫ 2. Праймеры второго раунда представлены в Таблице 2.

Разработанные праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген», Россия, Москва.

2.3. Сбор образцов

Отличительной способностью и несомненным преимуществом метода секвенирования NGS является возможность проведения идентификации в многокомпонентной продукции. Помимо целевой ДНК в ней присутствуют и фрагменты ДНК других составных компонентов продукта, которые могут быть как животного происхождения, так и растительно-го. Исходя из этих возможностей метода, были подготовлены 20 образцов разного вида и состава. Данные по образцам испытания представлены в Таблице 3.

Все образцы были предварительно исследованы в испытательной референс-лаборатории Национального центра безопасности продукции водного промысла и аквакультуры (ФГБУ «НЦБРП») другими молекулярно-диагностическими методами с целью определения видовой принадлежности.

Приготовление смешанных опытных образцов. Во избежание загрязнений с помощью стерильных и чистых инструментов, рыбу, используемую для приготовления смешанных образцов, разделяли на филе и измельчали до получения гомогенной массы. Далее в гомогенную массу ткани атлантической сельди массой 80 г добавляли гомогенную массу ткани тихоокеанской сельди массой 20 г и каплю пищевого красителя синего цвета, после чего смешивали до получения однородного цвета смеси, в результате чего получался образец 80%/20% (масса/масса), код образца CO1. Аналогично были приготовлены смешанные образцы CO2 и CO3.

До испытаний все образцы хранились при температуре минус 20 °С.

Таблица 2. Праймеры второго раунда

Table 2. Second round primers

Штрих-код	Олигонуклеотидные праймеры ПАРЫ 1	Штрихкод	Олигонуклеотидные праймеры ПАРЫ 2
IonXpress_1	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGG TAACGATg CCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_1	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGT AACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_2	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGA GAACGATg CCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_2	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGG ATTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_3	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGG ATTGATg CCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_3	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAG AACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_4	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAA GATCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_4	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAA ATCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_5	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAA GGAACGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_5	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGG AACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_6	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCAA GTTCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_6	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCAA TTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_7	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTG ATTGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_7	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGA TTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_8	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGG ATAACGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_8	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGGAT AACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_9	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCG GAACGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_9	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCG GAACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_10	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACC GAACGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_10	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACC AACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_11	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCG AATCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_11	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCGA ATCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_12	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTG GTTGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_12	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTG TTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_13	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAAC GGACGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_13	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAAC GACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_14	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGAG TGTCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_14	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGAGT GTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_15	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGA GGTCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_15	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAG GTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_16	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGA TGACGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_16	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGAT GACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_17	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATT CGTCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_17	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATT GTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_18	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAA TTGCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_18	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAAT TTCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_19	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTC GGACGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_19	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTCG GACGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca
IonXpress_20	<i>Forward</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATC CATCGATgCCTCTGCCcACAaTGGT <i>Reverse</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATaAGAAgTGGTTGG AAgcTCTca	IonXpress_20	<i>Forward</i> CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCTCTGCCcACAa TGGT <i>Reverse</i> CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATCC ATCGATaAGAAgTGGTTGGAAGcTCTca

Таблица 3. Кодировка, вид и состав образцов

Table 3. Codes, species and composition of samples

№ пп	Код образца	Наименование	Состав	Видовая принадлежность целевой ДНК	Образец предоставлен/приобретен	Подтверждение видовой принадлежности другими методами молекулярной диагностики
746–2020	Хек патагонский	Патагонских хек	Патагонских хек	Патагонских хек (Merluccius hubbsi)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод RFLP (Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов)
411–2021	Икра мойвы пробойная соленая	Икра мойвы, соль, растительное масло, пищевые добавки	Икра мойвы, соль, растительное масло, пищевые добавки	Мойва (Mallotus villosus)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод ПЦР-РВ
388–2021	Угорь жареный в соусе мороженный, филе	Филе угря на коже без костей, соевый соус 10% (вода, соевые бобы, пшеница, соль, сахар, кукурузный сироп, кукурузный крахмал)	Филе угря на коже без костей, соевый соус 10% (вода, соевые бобы, пшеница, соль, сахар, кукурузный сироп, кукурузный крахмал)	Американский речной угорь (Anguilla rostrata)	Коммерческая сеть	Испытания не проводились
1144–2021	Форель холодного копчения	Форель, соль, пищевой консервант	Форель, соль, пищевой консервант	Радужная форель (Oncorhynchus mykiss)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод ПЦР-РВ
1278–2021	Сельдь т/о крупная мороженная	Сельдь, соль	Сельдь, соль	Тихоокеанская сельдь (Clupea pallasii)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод секвенирования по Сенгеру
2332–2021	Сельдь атлантическая крупная жирная, слабосоленая	Сельдь, соль	Сельдь, соль	Атлантическая сельдь (Clupea harengus)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод секвенирования по Сенгеру
4958–2020	Филе атлантического лосося с костью с кожей мороженое	Атлантический лосось	Атлантический лосось	Атлантический лосось (Salmo salar)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод ПЦР-РВ
6255–2021	Сайра т/о натуральная с добавлением масла (консервы)	Рыба, масло растительное, соль, пряности	Рыба, масло растительное, соль, пряности	Сайра (Cololabis saira)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Идентифицирован вид дальневосточная сардина, или иваси (Sardinops melanostictus), метод секвенирования по Сенгеру
6420–2021	Баррамунди охлажденная	Баррамунди	Баррамунди	Латес, или баррамунди, или белый морской окунь (Lates calcarifer)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Идентифицирован вид суринамский лобот, или суринамская треххвостка (lobotes surinamensis), метод секвенирования по Сенгеру
6259–2021	Рыбные консервы (сайра)	Рыба, масло растительное, соль, пряности	Рыба, масло растительное, соль, пряности	Сайра (Cololabis saira)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Идентифицирован вид тихоокеанская сельдь (Clupea pallasii), метод секвенирования по Сенгеру
389–2021	Филе минтая без кожи без кости мороженое	Минтай	Минтай	Минтай (Gadus chalcogrammus)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод ПЦР-РВ
3209–2021	Мороженая пищевая рыбная продукция, треска атлантическая без кожи, порционное	Атлантическая треска	Атлантическая треска	Атлантическая треска (Gadus morhua)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод ПЦР-РВ
3599–2021	Желтохвост мороженный	Желтохвост	Желтохвост	Желтохвостая лакедра, или желтохвост (Seriola quinqueradiata)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод секвенирования по Сенгеру
4840–2020	Скумбрия атлантическая холодного копчения, нарезка	Скумбрия атлантическая	Скумбрия атлантическая	Атлантическая скумбрия (Scomber scombrus)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Идентифицирован вид японская скумбрия (Scomber japonicus), метод секвенирования по Сенгеру
4651–2020	Макрурус малоглазый потр. б/г с удалением тонкой хвостовой части мороженный	Макрурус малоглазый	Макрурус малоглазый	Малоглазый макрурус (Albatrossia rostrata)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод секвенирования по Сенгеру
4644–2020	Сардина т/о (иваси) н/р мороженная	Сардина иваси	Сардина иваси	Дальневосточная сардина, или иваси (Sardinops melanostictus)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод секвенирования по Сенгеру
4566–2020	Роллы «Филадельфия с угрем»	Угорь	Угорь	Речной угорь, (Anguilla anguilla)	ФГБУ «НЦБРИП»*	Подтвержден, метод секвенирования по Сенгеру
СО-1	Смешанный образец	Атлантическая сельдь 80%, тихоокеанская сельдь 20%	Атлантическая сельдь 80%, тихоокеанская сельдь 20%	Атлантическая сельдь (Clupea harengus), Тихоокеанская сельдь (Clupea pallasii)	ФГБУ «НЦБРИП»*	—
СО-2	Смешанный образец	Сайра 50%, иваси 50%	Сайра 50%, иваси 50%	Сайра (Cololabis saira), Дальневосточная сардина (Sardinops melanostictus)	ФГБУ «НЦБРИП»*	—
СО-3	Смешанный образец	Атлантическая треска 90%, минтай 10%	Атлантическая треска 90%, минтай 10%	Атлантическая треска (Gadus morhua), Минтай (Gadus chalcogrammus)	ФГБУ «НЦБРИП»*	—

* Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры.

2.4. Выделение ДНК

Основной принцип выделения ДНК заключается в экстрагировании ДНК, присутствующей в образце, а затем одновременной или последующей очистке ДНК от ингибиторов ПЦР (белков, полисахаридов и других соединений) [21].

Для проведения испытаний нами был выбран набор реагентов для выделения ДНК, сочетающий в себе метод СТАВ и метод выделения ДНК путем ее высаживания (сорбции) на частицах «Сорб-ГМО-Б», Синтол, Россия.

Метод СТАВ (метод гомогенного выделения с помощью цетилтриметиламмоний бромидом), в соответствии с которым тотальную ДНК выделяют путем экстракции в виде комплекса с цетилтриметиламмоний бромидом, был предложен Muggay M. G. и Thompson, W. F. Он относится к классическим методам выделения нуклеиновых кислот. В результате экстракции ДНК получается с максимальным выходом и минимальным количеством ингибиторов [22].

Метод выделения ДНК путем ее высаживания (сорбции) на частицах, разработанный Boom R. с коллегами, показал свою эффективность при выделении небольших количеств нуклеиновых кислот. В основе метода лежит лизис растительных клеток и последующего осаждения нуклеиновых кислот на частицах силикагеля или диатомовой земли в присутствии хаотропного агента — тиоцианата гуанидина [23].

Объединение двух методов в один позволило компенсировать недостатки каждого — длительное время выделения методом СТАВ, которое составляет более 4-х часов, и большие потери ДНК при выделении сорбционным методом [24].

2.5. Протокол испытания

Аmplification участка митохондриальной ДНК в области гена 16S рибосомальной РНК методом ПЦР проводили в конечном объеме 30 мкл, содержащем 2 мкл ДНК, 2,5 мкл 10x ПЦР буфера Б + Eva Green, 2,5 мкл MgCl₂ 25 мМ, 2 мкл dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфаты) 2,5 мМ, 0,5 мкл SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью ферментами антителами 5Е/мкл, 19 мкл ddH₂O и 2 мкл смеси праймеров в концентрации 6 пмоль/реакцию каждого праймера.

Реакцию проводили в амплификаторе qTOWER2.2 по следующей программе: первоначальный прогрев реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 6 мин, 35 циклов ПЦР, включающих денатурацию при температуре 95 °С в течение 15 сек, отжиг при температуре 50 °С на протяжении 25 сек и элонгацию при 72 °С на протяжении 25 сек, и окончательная достройка цепи при 72 °С в течение 10 мин.

Сбор ПЦР-продуктов после реакции амплификации проводили с использованием готового агарозного геля для отбора фрагментов при NGS E-Gel™ SizeSelect™ II Agarose Gels, 2% (Invitrogen™) на приборе E-Gel™ Power Snap (Invitrogen™).

Для присоединения олигонуклеотидных адаптеров для баркодирования фрагментов библиотеки ДНК использовали метод ПЦР. Конечный объем амплифицируемой смеси составлял 30 мкл, смесь включала 1 мкл ПЦР-продукта, 2,5 мкл 10x ПЦР буфера Б + Eva Green, 2,5 мкл MgCl₂ 25 мМ, 2 мкл dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфаты) 2,5 мМ, 0,5 мкл SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью ферментами антителами 5Е/мкл, 18 мкл ddH₂O и 4 мкл смеси праймеров в концентрации 6 пмоль/реакцию каждого праймера.

Измерение концентрации фрагментов ДНК проводят с использованием набора для определения количества ДНК Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) на флуориметре для определения количества ДНК Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific).

Оценку фрагментов ДНК проводят с использованием набора High Sensitivity DNA Kit, Agilent на биоанализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer System, Agilent. Количественный диапазон измерения набора High Sensitivity DNA Kit составлял 5–500 пг/мкл.

Подготовку библиотеки ДНК и нанесение ее на чип проводили на автоматической станции пробоподготовки Ion Chef System. Секвенирование библиотеки на генетическом анализаторе Ion Torrent Gene Studio S5.

3. Результаты и обсуждение

Из всех образцов испытания была выделена ДНК с чистотой, пригодной для постановки ПЦР. На графике флуоресценции, полученном с помощью программного обеспечения используемого прибора, присутствовало пересечение кривых флуоресценции с пороговой линией и характерное экспоненциальное нарастание флуоресценции сигнала, что говорит о положительной специфической реакции (Рисунок 1) и Таблица 4.

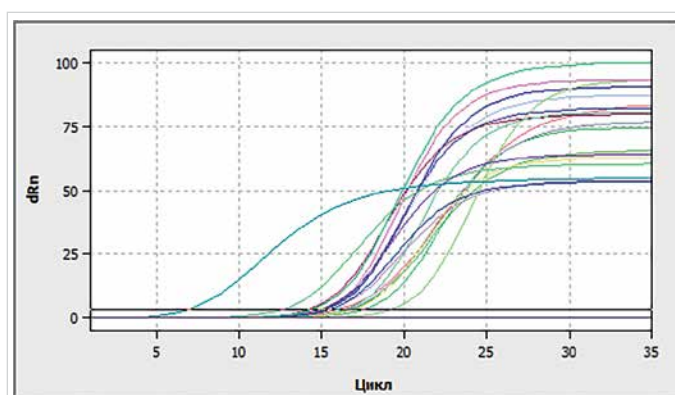


Рисунок 1. Амплификация участка митохондриальной ДНК. График флуоресценции
Figure 1. Amplification of the region of the mitochondrial DNA. Graph of fluorescence

Таблица 4. Значения Ct образцов испытания

Table 4. Ct values of test samples

№ лунки	Код образца	Значение Ct	№ лунки	Код образца	Значение Ct
B2	746–2020	16,01	C4	389–2021	15,11
B3	411–2021	15,07	C5	3209–2021	14,36
B4	388–2021	16,65	C6	3599–2021	12,57
B5	1144–2021	17,51	C7	4840–2020	19,16
B6	1278–2021	14,2	C8	4651–2020	15,03
B7	2332–2021	16,42	C9	4644–2020	14,86
B8	4958–2020	15,42	D2	4566–2020	15,39
B9	6255–2021	17,01	D3	CO-1	16,12
C2	6420–2021	16,38	D4	CO-2	17,48
C3	6259–2021	15,21	D5	CO-3	17,52

На электрофореграмме (Рисунок 2) показана длина полученных ПЦР-продуктов, которая соответствует требуемой и составляет ≈ 405–450 нп.

На биоанализаторе была определена длина ампликонов и молярная концентрация, которая необходима для разведения финального пула библиотеки ДНК перед секвенированием, на Рисунке 3 приведена гистограмма образца 746–2020.

После проведения секвенирования пула библиотеки ДНК оценивали его качество по детализации данных чипа. Покрываемость чипа составляла 93%, что является хорошим показателем (Рисунок 4).

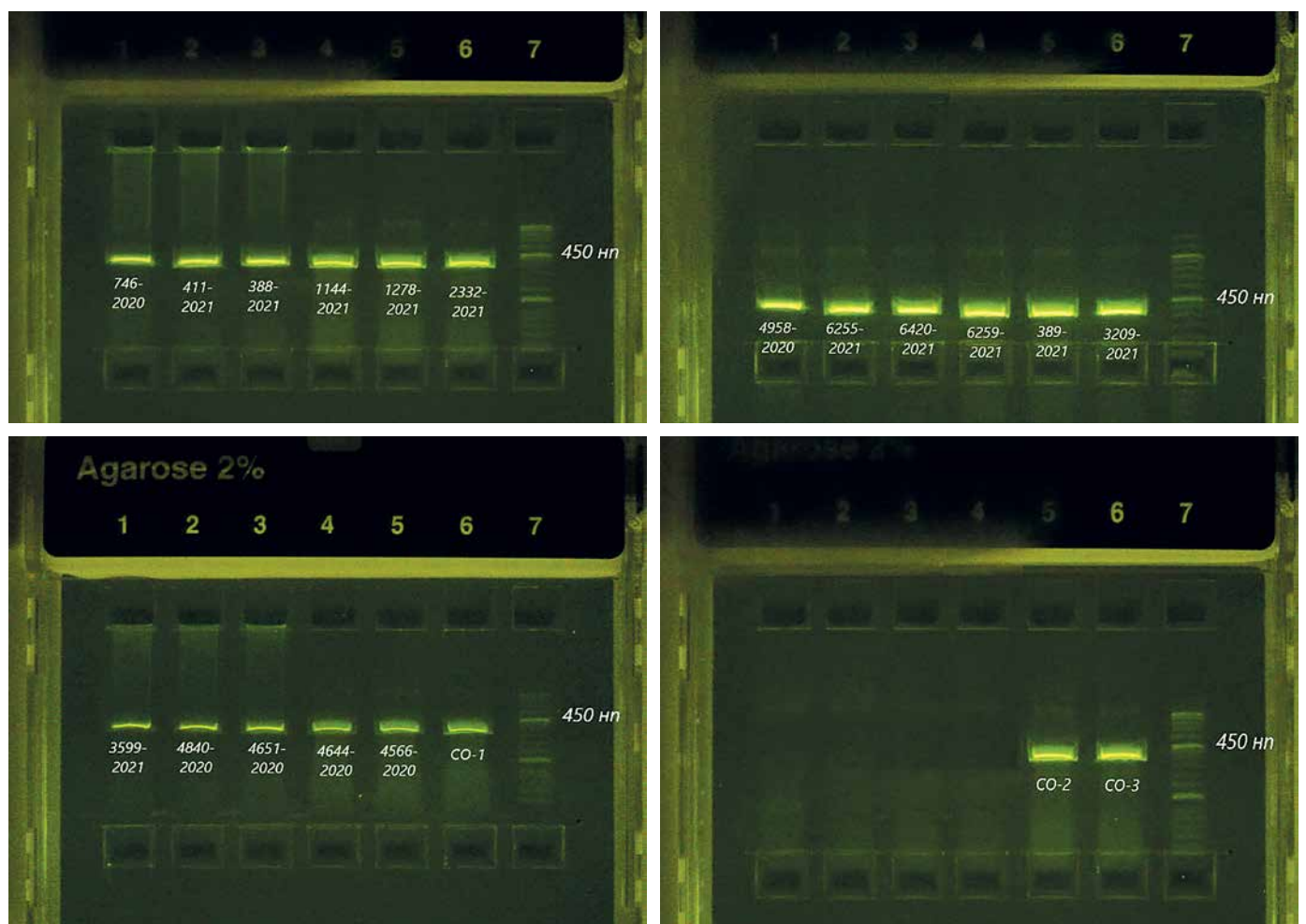


Рисунок 2. Электрофореграмма фрагментов ПЦР-продуктов образцов испытания
 Figure 2. The electrophoregram of fragments of PCR products of test samples

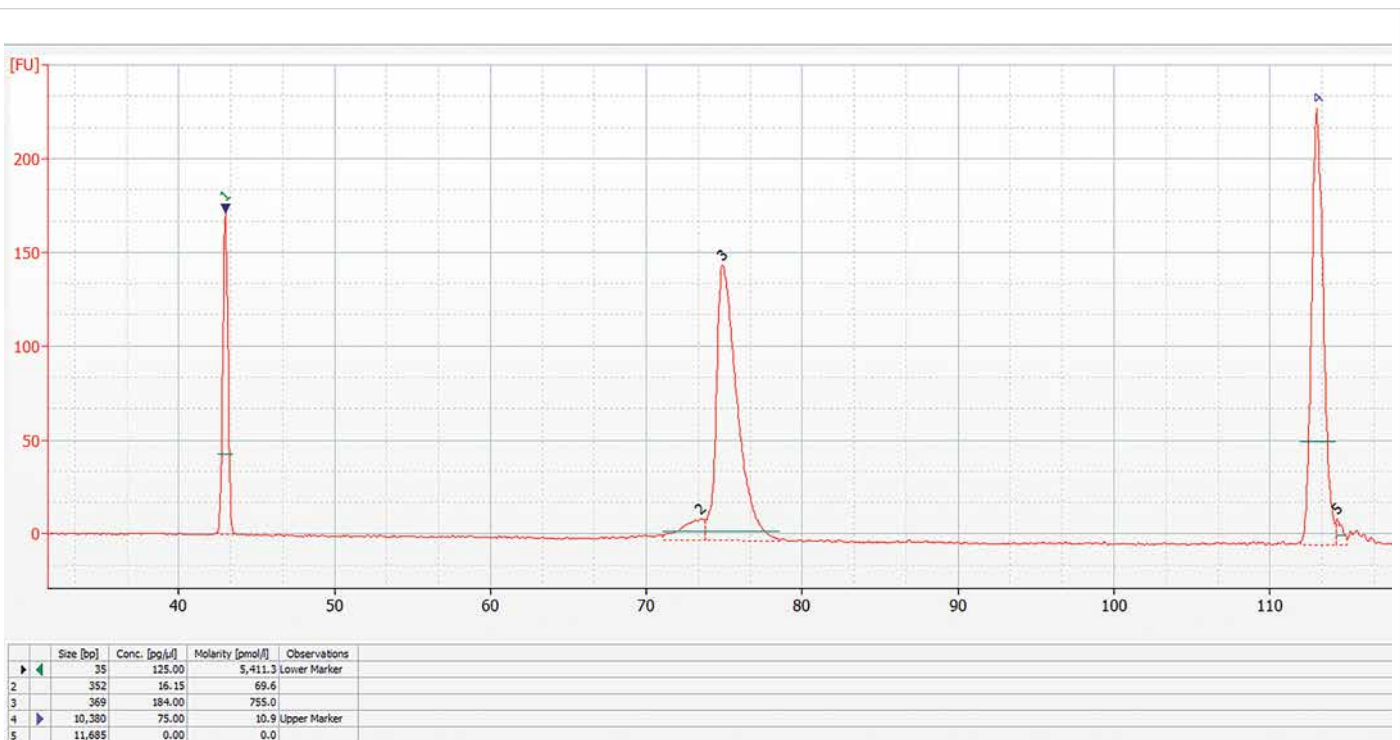


Рисунок 3. Гистограмма образца 746–2020. Молярная концентрация 755 пмоль/л, длина 369 бп
 Figure 3. The histogram of sample 746–2020. Molar concentration 755 pmol/L, length 369 bp

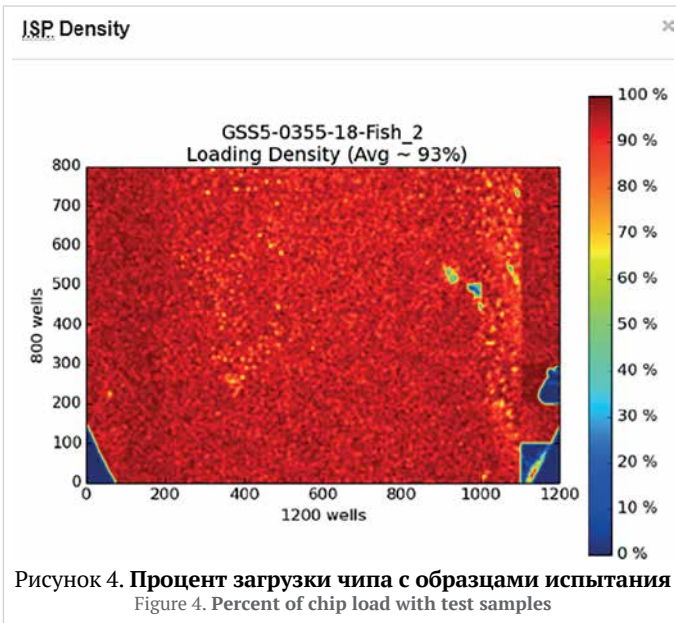


Рисунок 4. Процент загрузки чипа с образцами испытания

Процент полезных последовательностей библиотеки составлял 73%, а процент последовательностей низкого качества — 26% (Рисунок 5).

Оценивали также и гистограмму, показывающую длину ПЦР продукта, для которой был произведен сиквенс (Рисунок 6).

На гистограмме видно, что пул образцов имеет приблизительно одну длину, пик на 270–330 пн, без отсутствия дополнительных пиков. Данные результаты позволяют приступить к детекции результатов, которая проходит путем сравнения полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома, выделенного из образцов испытания, с известными последовательностями из баз данных GenBank, доступных через поисковой интернет-ресурс www.ncbi.nlm.nih.gov. в целях его идентификации.

На каждый образец было получено от 30000 до 50000 прочтений. Результаты по каждой пробе были приведены в формате uBAM — не выровненные чтения (нуклеотидные основания, покрытые считываниями, которые не выровнены по эталону), для наших задач данный формат был экспортирован в текстовый формат нуклеотидных последовательностей FASTQ (Рисунок 7).

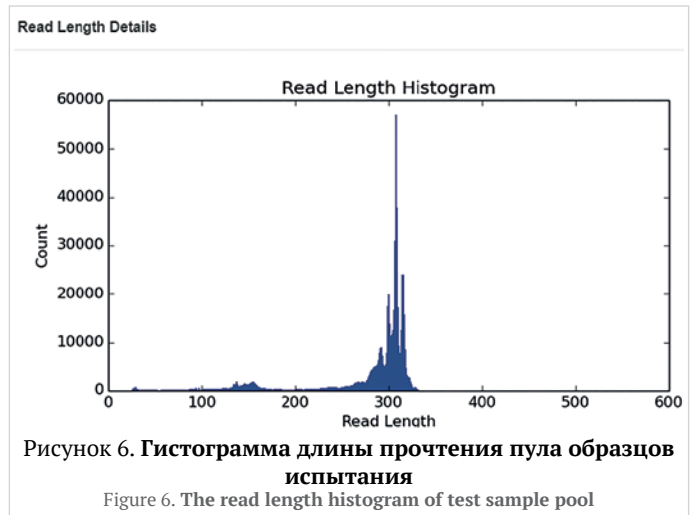


Рисунок 6. Гистограмма длины прочтения пула образцов испытания

Проанализировать вручную все 30000–50000 прочтений путем сравнения их с последовательностями из генетических баз данных — трудоемкая и длительная работа, для решения данного вопроса нами была разработана программа анализа полученных последовательностей по аналогии с поисковой системой BLAST, только наоборот. В программе BLAS вводится изучаемая или полученная последовательность вместе с другой входной информацией (база данных, размера «слова» (участка), значение величины E и др.) и запускается алгоритм поиска, после чего определяются выравнивания с максимальным количеством совпадений. В разработанной нами программе в качестве запроса на выравнивание выступает эталонная последовательность, которую сравнивают со всеми прочтениями испытуемого образца, полученными в результате секвенирования. Программа разработана на базе операционной системы linux, эталонные последовательности были загружены из генетической базы данных NCBI, итоговые результаты анализа представлены в таблице данных в файле excel (Рисунок 8).

Выборочные прочтения были проверены и стандартным методом посредством сравнения с использованием алгоритма BLAST. В качестве примеров на Рисунке 9 представлен сиквенс образца испытания 4644 и на Рисунке 10 представлен результат сравнения в базе NCBI. Совпадение сиквенса составляло 100%.

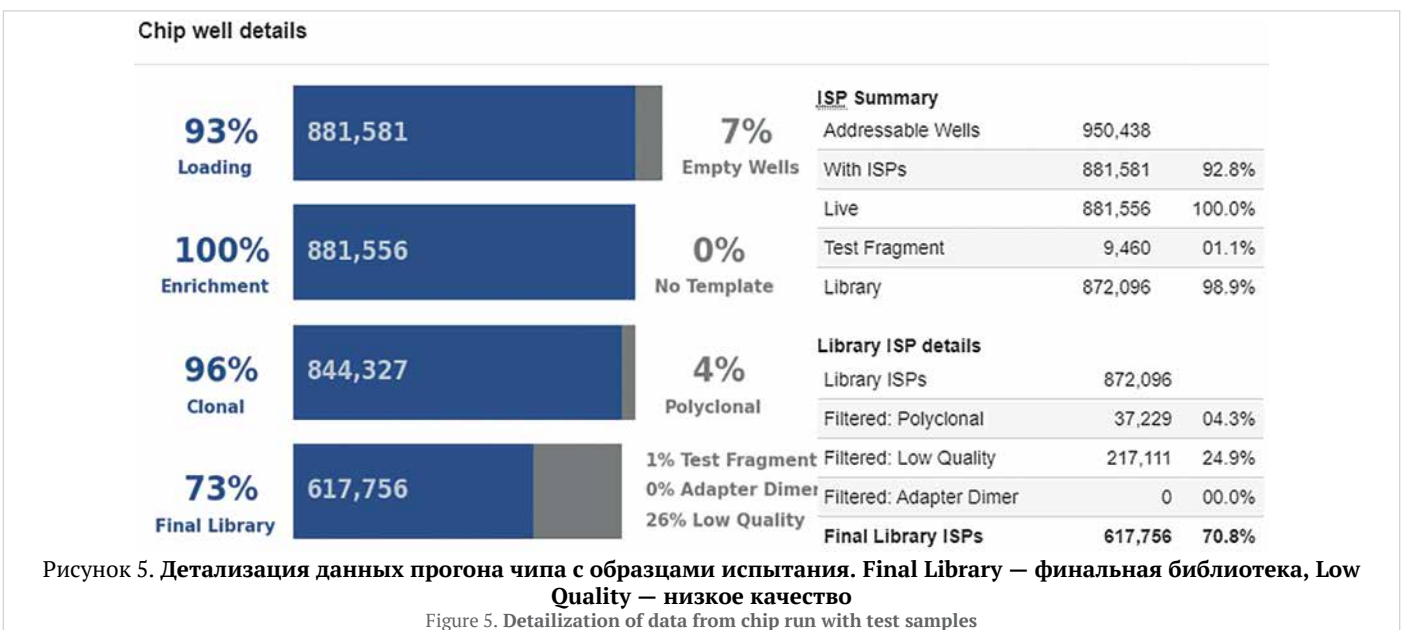


Рисунок 5. Детализация данных прогона чипа с образцами испытания. Final Library — финальная библиотека, Low Quality — низкое качество


```

@45T02:00002:00077
GCCTCTGCCCAATGGTATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAGACAAAAGATCAAACATG
TAAGAACCACAAACCAACCAAAAGGAAACGAGGCCCAAAAACCCACGTAAACTGATCTAAATG
TCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGGAAAGAAAGCCCCACGAGGAAACAGGGACACCCCTAAAC
TAAGAGAGACACCTTAAGCAACAGAAAATCTGACCAAAATGACCCAGGATACCTAATCCTGATCA
ACGAACCAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATTGAGAGCTTCCAACCACTTCTT
+
BA>AA;99;6?9;16C7AA; ;4:BA?A99; ;BCD>AABC?ABCC>443>999/39:
=>169;8// (/66 / (-7/9 (0)
@45T02:00004:00089
GCCTCTGCCCAATGGTATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAGACAAAAGATCAAACATG
TAAGAACCACAAACCAACCAAAAGGAAACGAGGCCCAAAAACCCACGTAAACTGATCTAAATG
TGTCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGGAAAGAAAGCCCCACGAGGAAACAGGGACACCCCTAA
ACTAAGAGAGACACCTTAAGCAACAGAAAATCTGACCAAAATGACCCAGGATACCTAATCCTGAT
CAACGAACCAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATTGAGAGCTTCCAACCACTTCTT
+
BA@0; ;9;A;B>@<AB8BCCC@CCBCCC@CBVB>BVCC??>?<39; ;399/39:9=
916666// (/88 / (/819,89)75; <
@45T02:00004:00093
GCCTCTGCCCAATGGTATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAGACAAAAGATCAAACATG
TAAGAACCACAAACCAACCAAAAGGAAACGAGGCCCAAAAACCCACGTAAACTGATCTAAATG
TGTCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGGAAAGAAAGCCCCACGAGGAAACAGGGACACCCCTAA
CTAAGAGAGACACCTTAAGCAACAGAAAATCTGACCAAAATGACCCAGGATACCTAATCCTGATC
AACGAACCAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATTGAGAGCTTCCAACCACTTCTT
+
@A@; ;CCF>BBB@B>9BC; ;9;AABADC@CCCC=CCB9AABB>8?
=; ;AAA3??>8>18888333 (399.86)?9A29171; ;.74949=>A; @; :199=>2==5
=<999?8900:000: ;3:<?AA9>?9?>=?2>=@>ABVCC5CC>CCCC; @@@@,
@; ; :C5; 5: BBA; @@>AAA?BBB<AAC@BBBCHCCCC@DCCC@BBB?CA@@@
3; ;<A@>@BBBBA9@?>@?>; =6==6; ?B999?000; @; >-00*
000) /77? 54<7<555555<6; ;?B>>; >8@0929431384
@45T02:00005:00083
GCCTCTGCCCAATGGTATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAGACAAAAGATCAAACATG
TAAGAACCACAAACCAACCAAAAGGAAACGAGGCCCAAAAACCCACGTAAACTGATCTAAATG
TGTCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGGAAAGAAAGCCCCACGAGGAAACAGGGACACCCCTAA
CTAAGAGAGACACCTTAAGCAACAGAAAATCTGACCAAAATGACCCAGGATACCTAATCCTGATC
AACGAACCAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATTGAGAGCTTCCAACCACTTCTT
+
@@>BBBVB=C@>BB8CBB@BBBVB@CCCC=CCB@BBVB=6<A:888-5A83//
*/9:9// (/88
@45T02:00006:00090
GCCTCTGCCCAATGGTATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAGACAAAAGATCAAACATG
TAAGAACCACAAACCAACCAAAAGGAAACGAGGCCCAAAAACCCACGTAAACTGATCTAAATG
TGTCTTCGGTTGGGGCGACCATGGGGGAAAGAAAGCCCCACGAGGAAACAGGGACACCCCTAA
CTAAGAGAGACACCTTAAGCAACAGAAAATCTGACCAAAATGACCCAGGATACCTAATCCTGATC
AACGAACCAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATTGAGAGCTTCCAACCACTTCTT
+
@@<=<<0//) // *0A6@99; ;CCDCC?ABCC>CCB?BBB=6==BCB>AA>8?A8>?
A333,3; ;3;>;>5=*0//) /..6. (.377=@18181=99:9-9?3<3<<999*8@0??
AA; BBBB?>>>>?BDD:>>OCACCCCC. ; ;7; CVC3; ; ; ;
* ; ;< ;B=ABBB; AAAS ; ; ; ; ;BB; ABV@BBB@CC?@<AA@B? ; ; ; AEB@0@3AB@0? ; ?
@???B?>?9??>?AAA: ;49:3; @A; ;< ;?@>?C<@6; ; ; ; ; ;0<< ; ;0; AB>B; ;< ; AAB>
    
```

Рисунок 7. Фрагмент текстового формата полученных нуклеотидных последовательностей образца испытания 4566. Всего 34 145 прочтений
 Figure 7. Fragment of the test format of the obtained nucleotide sequences of test sample 4566. In total, 34 145 reads

```

GCCTCTGCCCAATGGTATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAGACAAAACCAACCACGAA
AAGCGGCCCTAATTTGGAGCCCCAACCAACGTGATCTGGCATAAGTCTCTCGGTTGGGGCGACCA
CGGGAGATAGCACAGCTCCCGAGTGGATGGGGGACACCCCTAAACCAGAGCCACAGCTCTAAGTC
ACAAAAAATTTGACCAATAATGATCCGGTAAATGCCGACCAACGAGCAAGTTACCCCTAGGGATA
ACAGCGCAATTGAGAGCTTCCAACCACTTCTT
    
```

Рисунок 9. Выборочный сиквентс прочтения образца испытания 4644
 Figure 9. The sample sequence from test sample 4644

Таким образом, нами были проанализированы все 20 образцов испытания, результаты, полученные в ходе исследования, подтвердили результаты исследования данных образцов другими молекулярно-диагностическими методами. В образцах 6255–2021, 6420–2021, 6259–2021, 4840–2020 были выявлены несоответствия заявленному составу, ранее эти несоответствия были определены с использованием метода секвенирования по Сенгеру, в остальных образцах была подтверждена видовая принадлежность рыб, заявленная на маркировке. В Таблице 5 представлены результаты секвенирования NGS.

Рыба и рыбные продукты относятся к самым продаваемым товарам в мире. В интересах любого государства в мире, а также для общественного здравоохранения жизненно важно, чтобы как произведенные внутри страны, так и импортируемые рыбные продукты были безопасными, полезными и должным образом маркированными [25]. Идентификация видов рыб и рыбных продуктов стала важной задачей в рыбной промышленности. Расширение международной торговли, рост потребления рыбы и рыбных продуктов во всем мире и различные уровни предложения и спроса на определенные виды привели к случаям экономического мошенничества, при котором один вид рыбы заменяется другим [26].

Морфологический осмотр рыбных продуктов не всегда позволяет выявить неправильную маркировку видов, а технологическая или кулинарная обработка часто повреждает или удаляет диагностические характеристики, имеющие решающее значение для идентификации видов обычными таксономическими средствами.

Несмотря на то, что метод секвенирования с использованием технологии нового поколения является весьма дорогим, по сравнению с другими методами молекулярной

Эталон, вид	Образцы испытания																				
	746-2020	411-2021	388-2021	1144-2021	1278-2021	2332-2021	4958-2020	6255-2021	6420-2021	6259-2021	389-2021	3209-2021	3599-2021	4840-2020	4651-2020	4466-2020	4566-2020	CO-1	CO-2	CO-3	
<i>Merluccius_hubbisi</i>	97,00%																				
<i>Gadus_chalcogrammus</i>											98,6%										10,3%
<i>Gadus_morhua</i>												99,5%									89,4%
<i>Seriola_quinqueradiata</i>													100%								
<i>Oncorhynchus_mykiss</i>	0,6%	0,5%		99,5%																	
<i>Oncorhynchus_nerka</i>	0,1%	0,1%																			
<i>Scomber_scombrus</i>			0,0%	0,1%	0,4%	0,5%					0,4%				0,1%	0,7%				0,0%	0,0%
<i>Scomber_japonicus</i>	0,1%	0,1%						0,1%	0,1%			0,4%		100,0%	0,1%	0,8%					
<i>Mallotus_villosus</i>		99,0%																			
<i>Clupea_harengus</i>						99,5%									0,1%	0,2%		29,7%			
<i>Clupea_pallasii</i>					99,6%					100,0%								69,9%			
<i>Reinhardtius_hippoglossoides</i>																0,3%					
<i>Anguilla_anguilla</i>	0,6%	0,2%										0,0%		0,0%	0,2%	99,9%	0,0%	0,1%	0,1%		
<i>Anguilla_rostrata</i>			99,0%	0,4%							0,4%			0,1%	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	
<i>Sardinops_melanostictus</i>									98,3%												56,6%
<i>Salmo_salar</i>							100,0%														
<i>Lobotes_surinamensis</i>									94,1%												
<i>Cololabis_saira</i>															0,2%					43,0%	
<i>Sprattus_sprattus</i>											0,1%										
<i>Pleuronectes_platessa</i>									0,2%												
<i>Platichthys_stellatus</i>												0,0%									
<i>Kareius_bicoloratus</i>																					
<i>Pleurogrammus_monopterygi</i>	0,1%	0,1%														97,2%					
<i>Albatrossia_pectoralis</i>											0,0%	0,0%			99,6%						
<i>Coryphaenoides_filifer</i>									0,0%												
<i>Coryphaenoides_ecrolepis</i>									0,7%												
<i>Coryphaenoides_longifilis</i>									0,1%												
% совпадения прочтений с эталоном	98,4%	100,0%	99,1%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	98,4%	95,1%	100,0%	99,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,9%	99,7%	99,8%	99,9%	
Всего прочтений	31240	32985	49451	39881	31297	29274	46225	35995	36751	46328	34145	42036	48596	51946	35981	36405	50390	42958	56085	52313	

Рисунок 8. Таблица совпадений прочтений образцов испытания с эталонными сиквенсами из генетической базы данных NCBI

Figure 8. Table of matches between test sample reads and reference sequences from the NCBI genetic database

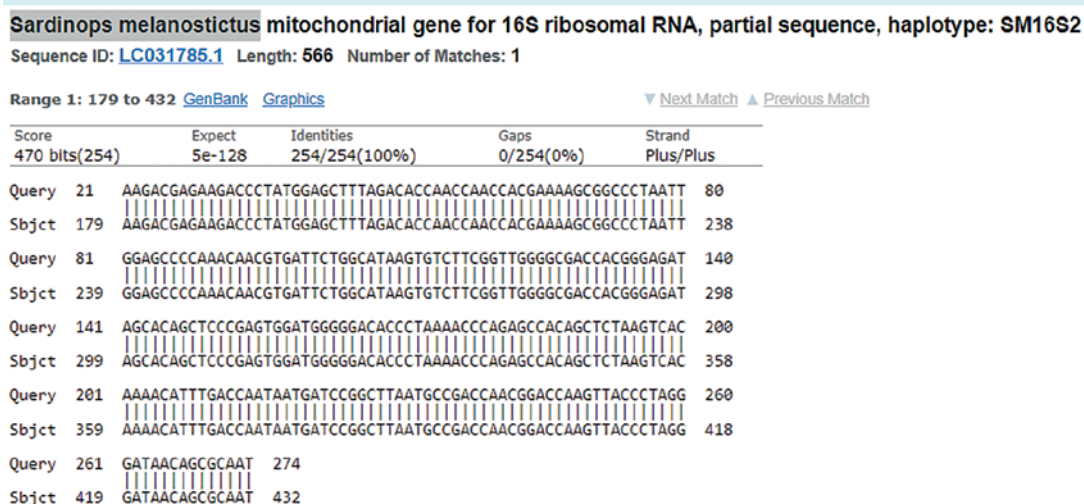


Рисунок 10. Результат сравнения сиквенса образца испытания 4644 в базе NCBI
 Figure 10. The result of sequence comparison of test sample 4644 in the NCBI database

Таблица 5. Результаты исследования образцов испытания
 Table 5. Results of the analysis of test samples

Код образца	Заявленная видовая принадлежность на маркировке продукта	Результаты другими методами молекулярной диагностики	Результаты секвенирования NGS
746–2020	Патагонских хек (<i>Merluccius hubbsi</i>)	Патагонских хек (<i>Merluccius hubbsi</i>)	Патагонских хек (<i>Merluccius hubbsi</i>)
411–2021	Мойва (<i>Mallotus villosus</i>)	Мойва (<i>Mallotus villosus</i>)	Мойва (<i>Mallotus villosus</i>)
388–2021	Американский речной угорь (<i>Anguilla rostrata</i>)	—	Американский речной угорь (<i>Anguilla rostrata</i>)
1144–2021	Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
1278–2021	Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)	Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)	Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)
2332–2021	Атлантическая сельдь (<i>Clupea harengus</i>)	Атлантическая сельдь (<i>Clupea harengus</i>)	Атлантическая сельдь (<i>Clupea harengus</i>)
4958–2020	Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)	Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)	Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)
6255–2021	Сайра (<i>Cololabis saira</i>)	Дальневосточная сардина (<i>Sardinops melanostictus</i>)	Дальневосточная сардина (<i>Sardinops melanostictus</i>)
6420–2021	Баррамунди (<i>Lates calcarifer</i>)	Суринамский лобот, или суринамская треххвостка (<i>lobotes surinamensis</i>)	Суринамский лобот, или суринамская треххвостка (<i>lobotes surinamensis</i>)
6259–2021	Сайра (<i>Cololabis saira</i>)	Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)	Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)
389–2021	Минтай (<i>Gadus chalcogrammus</i>)	Минтай (<i>Gadus chalcogrammus</i>)	Минтай (<i>Gadus chalcogrammus</i>)
3209–2021	Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>)	Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>)	Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>)
3599–2021	Желтохвост (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Желтохвост (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Желтохвост (<i>Seriola quinqueradiata</i>)
4840–2020	Атлантическая скумбрия (<i>Scomber scombrus</i>)	Японская скумбрия (<i>Scomber japonicus</i>)	Японская скумбрия (<i>Scomber japonicus</i>)
4651–2020	Малоглазый макрурус (<i>Albatrossia pectoralis</i>)	Малоглазый макрурус (<i>Albatrossia pectoralis</i>)	Малоглазый макрурус (<i>Albatrossia pectoralis</i>)
4644–2020	Дальневосточная сардина, или иваси (<i>Sardinops melanostictus</i>)	Дальневосточная сардина, или иваси (<i>Sardinops melanostictus</i>)	Дальневосточная сардина, или иваси (<i>Sardinops melanostictus</i>)
4566–2020	Речной угорь, (<i>Anguilla anguilla</i>)	Речной угорь, (<i>Anguilla anguilla</i>)	Речной угорь, (<i>Anguilla anguilla</i>)
CO-1	Атлантическая сельдь (<i>Clupea harengus</i>), Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)	—	Атлантическая сельдь (<i>Clupea harengus</i>), Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)
CO-2	Сайра (<i>Cololabis saira</i>), Дальневосточная сардина (<i>Sardinops melanostictus</i>)	—	Сайра (<i>Cololabis saira</i>), Дальневосточная сардина (<i>Sardinops melanostictus</i>)
CO-3	Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>), Минтай (<i>Gadus chalcogrammus</i>)	—	Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>), Минтай (<i>Gadus chalcogrammus</i>)

диагностики, проведенные исследования подтверждают потенциал применения данной методики для обеспечения однозначного определения видов рыб в рыбных продуктах и имеет ряд преимуществ. Во-первых, это проведение идентификации составного или многокомпонентного продукта, в котором могут присутствовать несколько видов рыб, в данном случае за 1 исследование будут идентифицированы сразу все виды рыб, которые входят в состав исследуемого образца. Во-вторых, оснащение испытательной лаборатории новыми, передовыми в науке и технике методами исследования, позволяют выполнять лабораторные исследования с использованием отечественных и международных методов и стандартов проведения испытаний, а также говорит о высоком уровне и квалификации специалистов.

Проведенные нами испытания образцов позволили не только подтвердить заявленный состав, но и выявить несоответствие. Так, в двух образцах консервированной рыбной продукции «Сайра тихоокеанская натуральная с добавлением масла» была выявлена замена: в одном образце — замена рыбой вида дальневосточная сардина (иваси), во втором — рыбой вида тихоокеанская сельдь. Одной из вероятных причин такой замены, по мнению председателя рыбного союза Александра Панина, может выступать ухудшение ситуации с промыслом сайры и уходом ее дальше в Тихий океан, в связи с чем она стала труднодоступна не только для российского флота, но и для лидеров отрасли (Китай, Тайвань и Япония). Одновременно с этим вылов иваси нарастал, и это привело к тому, что сайра стала дороже иваси в семь раз: цена иваси — 40 руб./кг, а сайры — более 300 руб./за кг [27]. Данная ситуация привела к спекуляции на традиционной народной любви к сайре и подтолкнула недобросовестных рыбопромышленников продолжать выпускать под видом консервированной сайры гораздо более доступную по стоимости рыбу иваси, а в некоторых случаях и сельдь.

Подмена, выявленная в образце охлажденной рыбы вида баррамунди другой рыбой вида суринамский лобот, может быть также связана с экономической выгодой для поставщиков баррамунди. Баррамунди в Россию экспортируется из других стран и стоит на российском рынке достаточно дорого, порядка 2000–3000 руб./кг, суринамский лобот же на территории России не имеет особого промыслового значения. Несмотря на то, что данная рыба имеет достаточно вкусное мясо и не уступает по пищевой ценности баррамунди, ее не встретишь на прилавках российских магазинов.

В пробе «Скумбрия атлантическая холодного копчения» была идентифицирована рыба вида японская скумбрия. И атлантическая, и японская скумбрия относятся к одному роду рыб скумбрии, оба вида представлены на российском рынке. По данным Санкт-Петербургской общественной организации потребителей «Общественный контроль», которые проводили контрольную закупку девяти образцов скумбрии холодного копчения в вакуумной упаковке в разных торговых сетях, была выявлена фальсификация в пяти образцах, в четырех из них наблюдалась полная замена атлантической скумбрии, в одном — частичная. [28]. Следует отметить, что видовую принадлежность определяли по морфологическим признакам и по массовой доле жира, что тоже может косвенно подтвердить замену, так как атлантическая скумбрия более жирная. Применение методов, основанных на анализе ДНК, в частности секвенирование NGS, существенно расширит ассортимент продукции, которую можно будет исследовать, не ограничиваясь только теми продуктами, которые имеют подходящий внешний вид для морфоло-

гической оценки. В этом случае масштаб выявленной фальсификации может быть в разы выше.

В испытательных лабораториях во всем мире, как частных, так и государственных, обычно используется широкий спектр методов для видовой идентификации рыбной продукции, но также рассматриваются альтернативные приемы к разработке новых и быстрых методов дифференциации видов на основе ДНК, в том числе методы NGS, также известные как высокопроизводительное секвенирование [14].

Полученные нами результаты аналогичны описываемым в работе Alice Giusti с соавторами, которые занимались идентификацией видов рыб в продуктах на основе сурими с применением секвенирования нового поколения. В статье был описан метод NGS, как поворотный момент в области контроля пищевых продуктов, особенно для идентификации видов в матрицах, состоящих из смеси двух и более видов. В своих исследованиях они анализировали шестнадцать коммерческих образцов сурими, произведенных как в странах ЕС, так и за пределами ЕС с целью оценки неправильной маркировки. В целом в ходе анализа была обнаружена ДНК 13 семейств, 19 родов и 16 видов рыб, а также 3 семейств, 3 родов и 3 видов головоногих моллюсков. Образцы, произведенные в странах, не входящих в ЕС, демонстрировали более высокую вариативность по своему составу. Было обнаружено, что 37,5% продуктов с сурими имеют неправильную маркировку. Среди них 25% добровольно заявили о видах, отличных от идентифицированных, а 25% (все произведенные в странах, не входящих в ЕС) не сообщили о наличии моллюсков на этикетке, что может представлять потенциальную угрозу для здоровья потребителей, страдающих аллергией [29].

Park J. Y. с коллегами описывает идентификацию видов рыб в рыбном пироге методом NGS. В своей работе авторы также отмечали важность метода секвенирования нового поколения. Данным методом было идентифицировано 39 видов рыб по последовательности ДНК [30].

Помимо идентификации рыбной продукции существуют и работы, посвященные идентификации методом NGS в мясных продуктах. Так, Bertolini F. с соавторами опубликовали исследование по применению секвенирования нового поколения для идентификации видов мяса в смесях ДНК. В своей работе они показали, что технология Ion Torrent NGS может быть применена для идентификации млекопитающих и птиц в смеси в продуктах, и потенциально предложенный ими протокол исследования может быть применен в рутинных анализах для определения видов не только в образцах мяса или продуктах на основе мяса, но и во многих других прикладных областях, в которых необходима эта информация [31].

Tillmar A. O. с коллегами также описали метод секвенирования как универсальный метод идентификации млекопитающих в смеси ДНК. Эксперименты были проведены на приготовленных опытных образцах, содержащих смесь ДНК разных видов и на подлинных образцах судебных материалов. Результаты оказались многообещающими, позволяя различать более 99,9% видов млекопитающих, а также обнаруживать второстепенные компоненты всего в 1% от смешанной пробы [32].

Таким образом, проведенные исследования выявили важные управленческие последствия, свидетельствующие о необходимости внедрения эффективных и точных программ мониторинга и отслеживания. Основываясь на полученных результатах, можно определить существующую потребность в усилении проверок импортеров, розничных торговцев и дистрибьюторов, чтобы снизить вероятность фальсификаций. Недобросовестная и вводящая в заблуждения практика может иметь место в ресторанах, а также на уровне производителей и дистрибьюторов. Замена видов может быть преднамеренной для определенных видов рыб и продуктов из-за эконо-

мической выгоды вследствие различной ценности, а также непреднамеренной вследствие ошибочной идентификации вида по морфологическим признакам. В любом случае, будь то преднамеренная или непреднамеренная фальсификация, результаты подчеркивают необходимость повышения прослеживаемости пищевых рыбных продуктов и оценки сырья.

4. Выводы

Использование надежных, быстрых и эффективных методов для проверки подлинности видов рыб и рыбных

продуктов имеет решающее значение для защиты прав потребителей и борьбы с мошенническими действиями. Учитывая необходимость сделать аналитические методы более доступными, можно сделать вывод, что внедрение молекулярно-диагностических методов будет иметь позитивные последствия с точки зрения защиты прав потребителя. Секвенирование NGS представляет ценный инструмент в области аутентификации пищевых рыбных продуктов, который позволит изменить практику рынка, особенно в отношении коммерчески важных видов рыб.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P. et al. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of "palombo" (*Mustelus spp.*). *Food Research International*, 43(1), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.009>
- Международная сеть органов по безопасности пищевых продуктов (ИНФОСАН). Электронный ресурс https://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_1007_ru.pdf Дата обращения 15.05.2022
- ИНФОСАН No. 3/2006 — Пищевые аллергии. Электронный ресурс https://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_allergy_June06_ru.pdf Дата обращения 15.03.2022.
- CXS1–1985 General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods. Retrieved from https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B1-1985%252FCXS_001e.pdf Accessed March 14, 2022.
- Pinto, A.D., Pinto, P.D., Terio, V., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E. et al. (2013). DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chemistry*, 141(3), 1757–1762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.093>
- Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 280–295. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x>
- Regulation (EC) No 1224/2009 establishing a system for ensuring compliance with the common fisheries policy. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/LSU/?uri=CELEX%3A32009R1224> Accessed March 14, 2022
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32002R0178> Accessed March 14, 2022
- Regulation (EU) No 1379/2013 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2013 on the common organisation of the markets in fishery and aquaculture products, amending Council Regulations (EC) No 1184/2006 and (EC) No 1224/2009 and repealing Council Regulation (EC) No 104/2000 Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013R1379&qid=1649920599842> Accessed March 14, 2022
- Marko, P. B., Lee, S. C., Rice, A. M., Gramling, J. M., Fitzhenry, T. M., McAlister, J. S. et al. (2004). Mislabeling of a depleted reef fish. *Nature*, 430(6997), 309–310. <https://doi.org/10.1038/430309b>
- Logan, C. A., Alter, S. E., Haupt, A. J., Tomalty, K., Palumbi, S. R. (2008). An impediment to consumer choice: overfished species are sold as Pacific red snapper. *Biological Conservation*, 141(6), 1591–1599.
- Pardo, M. A., Jiménez, E., Pérez-Villarreal, B. (2016). Misdescription incidents in seafood sector. *Food Control*, 62, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.048>
- Von Der Heyden, S., Barendse, J., Seebregts, A. J., Matthee, C. A. (2010). Misleading the masses: detection of mislabelled and substituted frozen fish products in South Africa. *ICES Journal of Marine Science*, 67(1), 176–185. <https://doi.org/10.1093/icesjms/bsp222>
- Verrez-Bagnis, V., Sotelo, C. G., Mendes, R., Silva H., Kappel, K., Schröder, U. (2019). Methods for seafood authenticity testing in Europe. *Reference Series in Phytochemistry*, 2063–2117. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_69
- Agnew, D. J., Pearce, J., Pramod, G., Peatman T., Watson R., Beddington, J. R. et al. (2009). Estimating the worldwide extent of illegal fishing. *PLoS ONE*, 4(2), Article e4570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004570>
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M. et al. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>
- Rasmussen Hellberg, R. S., Morrissey, M. T. (2011). Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *Journal of Laboratory Automation*, 16(4), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.07.004>
- Bybee, S.M., Bracken-Grissom, H., Haynes, B.D., Hermansen R. A., Byers R. L., Clement M. J. et al. (2011). Targeted amplicon sequencing (TAS): A scalable next-gen approach to multilocus, multitaxa phylogenetics. *Genome Biology and Evolution*, 3(1), 1312–1323. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr106>
- Rusk, N. (2010). Torrents of sequence. *Nature Methods*, 8(1), 44–44. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.330>
- Purushothaman, S., Toumazou, C., Ou, C.-P. (2006). Protons and single nucleotide polymorphism detection: A simple use for the Ion Sensitive Field Effect Transistor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 964–968. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.06.069>
- МР 4.2.0019–11 Методические рекомендации. 4.2. Методы контроля. Биологические факторы. Идентификация сырьевого состава мясной продукции. Электронный ресурс https://www.rospotrebнадзор.ru/upload/iblock/e6f/mr-4.2.0019_11.pdf Дата обращения 15.03.2022.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of higher weight DNA. *Nuclear Acids Research*, 8(19), 4321–4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-Van Dillen, P. M. E., Van Der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Алексеев, Я. И. (2017). Разработка технологии молекулярно-генетического анализа генетически модифицированных сельскохозяйственных растений и продуктов их переработки. Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 2017.
- FDA. (2012). DNA-based seafood identification. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/science-research-food/dna-based-seafood-identification> Accessed March 01, 2022
- Wong, E. H.-K., Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41(8), 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.005>
- Панин, А. (2021). В каких консервах сайру заменяют более дешевой рыбой? Электронный ресурс <https://rskr.ru/tips/spetsproekty/v-kakikh-konservakh-sayru-zamenyayut-bolee-deshevoy-ryboj/> Дата обращения 01.02.2022.
- Торговые сети продают дешевую восточную скумбрию под видом дорогой атлантической. Электронный ресурс <https://www.spb-kontrol.ru/ekspertizy-2020/773-torgovye-seti-prodayut-deshevuyu-vostochnuyu-skumbriyu-pod-vidom-dorogoj-atlanticheskoy> Дата обращения 14.03.2022.
- Giusti, A., Armani, A., Sotelo, C. G. (2017). Advances in the analysis of complex food matrices: Species identification in surimi-based products using Next Generation Sequencing technologies. *PLoS ONE*, 12(10), Article e0185586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185586>
- Park, J.Y., Lee, S.Y., An, C.M., Kang J.-H., Kim J.-H., Chai J. C. et al. (2012). Comparative study between Next Generation Sequencing Technique and identification of microarray for Species Identification within blended food products. *Biochip Journal*, 6(4), 354–361. <https://doi.org/10.1007/s13206-012-6407-x>
- Bertolini, F., Ghionda, M.C., D'Alessandro, E., Geraci C., Chiofalo, V., Fontanesi, L. (2015). A next generation semiconductor based sequencing approach for the identification of meat species in DNA mixtures. *PLoS One*, 10(4), Article 0121701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121701>
- Tillmar, A.O., Dell'Amico, B., Welander, J., Holmlund, G. (2013). A universal method for species identification of mammals utilizing next generation sequencing for the analysis of DNA mixtures. *PLoS One*, 8, Article e83761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083761>

REFERENCES

- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P. et al. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of "palombo" (*Mustelus spp.*). *Food Research International*, 43(1), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.009>
- INFOSAN — International Food Safety Authorities Network. Retrieved from https://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_1007_ru.pdf Accessed March 14, 2022. (In Russian)
- Allergies. INFOSAN Information Note No. 3/2006 — Food allergies. Retrieved from https://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_allergy_June06_ru.pdf Accessed March 14, 2022. (In Russian)
- CXS1–1985 General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods. Retrieved from https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh_proxy/en/?link=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B1-1985%252FCXS_001e.pdf Accessed March 14, 2022.
- Pinto, A.D., Pinto, P.D., Terio, V., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E. et al. (2013). DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chemistry*, 141(3), 1757–1762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.093>
- Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 280–295. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x>
- Regulation (EC) No 1224/2009 establishing a system for ensuring compliance with the common fisheries policy. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/LSU/?uri=CELEX%3A32009R1224> Accessed March 14, 2022
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32002R0178> Accessed March 14, 2022
- Regulation (EU) No 1379/2013 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2013 on the common organisation of the markets in fishery and aquaculture products, amending Council Regulations (EC) No 1184/2006 and (EC) No 1224/2009 and repealing Council Regulation (EC) No 104/2000 Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013R1379&qid=1649920599842> Accessed March 14, 2022
- Marko, P. B., Lee, S. C., Rice, A. M., Gramling, J. M., Fitzhenry, T. M., McAlister, J. S. et al. (2004). Mislabeling of a depleted reef fish. *Nature*, 430(6997), 309–310. <https://doi.org/10.1038/430309b>
- Logan, C. A., Alter, S. E., Haupt, A. J., Tomalty, K., Palumbi, S. R. (2008). An impediment to consumer choice: overfished species are sold as Pacific red snapper. *Biological Conservation*, 141(6), 1591–1599.
- Pardo, Miguel Ángel; Jiménez, Elisa; Pérez-Villarreal, Begoña (2016). Misdescription incidents in seafood sector. *Food Control*, 62(), 277–283. [doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.048](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.048)
- Von Der Heyden, S., Barendse, J., Seebregts, A. J., Matthee, C. A. (2010). Misleading the masses: detection of mislabelled and substituted frozen fish products in South Africa. *ICES Journal of Marine Science*, 67(1), 176–185. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsp222>
- Verrez-Bagnis, V., Sotelo, C. G., Mendes, R., Silva H., Kappel, K., Schröder, U. (2019). Methods for seafood authenticity testing in Europe. *Reference Series in Phytochemistry*, 2063–2117. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_69
- Agnew, D. J., Pearce, J., Pramod, G., Peatman T., Watson R., Beddington, J. R. et al. (2009). Estimating the worldwide extent of illegal fishing. *PLoS ONE*, 4(2), Article e4570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004570>
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M. et al. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>
- Rasmussen Hellberg, R. S., Morrissey, M. T. (2011). Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *Journal of Laboratory Automation*, 16(4), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.07.004>
- Bybee, S.M., Bracken-Grissom, H., Haynes, B.D., Hermansen R. A., Byers R. L., Clement M. J. et al. (2011). Targeted amplicon sequencing (TAS): A scalable next-gen approach to multilocus, multitaxa phylogenetics. *Genome Biology and Evolution*, 3(1), 1512–1523. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr106>
- Rusk, N. (2010). Torrents of sequence. *Nature Methods*, 8(1), 44–44. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f330>
- Purushothaman, S., Toumazou, C., Ou, C.-P. (2006). Protons and single nucleotide polymorphism detection: A simple use for the Ion Sensitive Field Effect Transistor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 964–968. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.06.069>
- MR4.2.0019–11 Methodological recommendations. 4.2. Control methods. Biological factors. Identification of the raw material composition of meat products. Retrieved from https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/e6f/mr-4.2.0019_11.pdf Accessed March 14, 2022. (In Russian)
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of higher weight DNA. *Nuclear Acids Research*, 8(19), 4321–4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-Van Dillen, P. M. E., Van Der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Alekseev, Ya.I. (2017). Development of technology for molecular genetic analysis of genetically modified agricultural plants and their processed products. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences. Moscow: All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 2017. (In Russian)
- FDA. (2012). DNA-based seafood identification. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/science-research-food/dna-based-seafood-identification> Accessed March 01, 2022
- Wong, E. H.-K., Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41(8), 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.005>
- Panin, A. (2021). In which canned saury is replaced with cheaper fish? Retrieved from <https://rskrf.ru/tips/spetsproekty/v-kakikh-konservakh-sayru-zamenyayut-bolee-deshevoy-ryboy/> Accessed February 01, 2022. (In Russian)
- Retail chains sell cheap oriental mackerel under the guise of expensive Atlantic. Retrieved from <https://www.spbkontrol.ru/ekspertizy-2020/773-torgovye-seti-prodayut-deshevuyu-vostochnuyu-skumbriyu-pod-vidom-dorogoj-atlanticheskoy> Accessed March 14, 2022. (In Russian)
- Giusti, A., Armani, A., Sotelo, C. G. (2017). Advances in the analysis of complex food matrices: Species identification in surimi-based products using Next Generation Sequencing technologies. *PLoS ONE*, 12(10), Article e0185586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185586>
- Park, J.Y., Lee, S.Y., An, C.M., Kang J.-H., Kim J.-H., Chai J. C. et al. (2012). Comparative study between Next Generation Sequencing Technique and identification of microarray for Species Identification within blended food products. *Biochip Journal*, 6(4), 354–361. <https://doi.org/10.1007/s13206-012-6407-x>
- Bertolini, F., Ghionda, M.C., D'Alessandro, E., Geraci C., Chiofalo, V., Fontanesi, L. (2015). A next generation semiconductor based sequencing approach for the identification of meat species in DNA mixtures. *PLoS One*, 10(4), Article 0121701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121701>
- Tillmar, A.O., Dell'Amico, B., Welander, J., Holmlund, G. (2013). A universal method for species identification of mammals utilizing next generation sequencing for the analysis of DNA mixtures. *PLoS One*, 8, Article e83761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083761>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
<p>Принадлежность к организации</p> <p>Фомина Татьяна Алексеевна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Начальник отдела молекулярно-диагностических исследований испытательной референс-лаборатории, Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры 129626, Москва, Графский переулок, д. 14–1 Тел.: +7–903–732–74–19 E-mail: fomina1032@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8848-0632</p>	<p>Affiliation</p> <p>Tatyana A. Fomina, Candidate of Technical Sciences, Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Head of the Department of Molecular Diagnostic Research at the Testing Reference Laboratory, National Centre for Safety of Aquatic Fisheries Products and Aquaculture 14–1, Grafskiy per., 129626, Moscow, Russia Tel.: +7–903–732–74–19 E-mail: fomina1032@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8848-0632</p>
<p>Кулешова Мария Геннадьевна — аспирант, Лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Молекулярный биолог, Отдел молекулярно-диагностических исследований испытательной референс-лаборатории, Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры 129626, Москва, Графский переулок, д. 14–1 Тел.: +7–901–597–91–25 E-mail: mariakulg@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5581-7534</p>	<p>Mariya G. Kuleshova, Graduate Student, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Molecular Biologist, Department of Molecular Diagnostic Research at the Testing Reference Laboratory, National Centre for Safety of Aquatic Fisheries Products and Aquaculture 14–1, Grafskiy per., 129626, Moscow, Russia Tel.: +7–901–597–91–25 e-mail: mariakulg@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5581-7534</p>
<p>Минаев Михаил Юрьевич — кандидат технических наук, руководитель лаборатории Молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7–495–676–95–11 (доб. 401) E-mail: m.minaev@fncps.ru https://orcid.org/0000-0002-0038-9744 * автор для контактов</p>	<p>Mikhail Yu. Minaev, Candidate of Technical Sciences, Head of Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7–495–676–95–11 (401) E-mail: m.minaev@fncps.ru https://orcid.org/0000-0002-0038-9744 * corresponding author</p>
<p>Коноров Евгений Андреевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7–985–153–31–88 E-mail: casqy@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8748-9117</p>	<p>Evgeniy A. Konorov, Candidate of Technical Sciences, Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7–985–153–31–88 e-mail: casqy@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8748-9117</p>
<p>Критерии авторства</p> <p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.</p>	<p>Contribution</p> <p>Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.</p>
<p>Конфликт интересов</p> <p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.</p>	<p>Conflict of interest</p> <p>The authors declare no conflict of interest.</p>