**УДК 637.14:634**

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

**Мудрикова О.В., Архипов А.Н.**

*ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, Россия (650056, г. Кемерово, б-р Строителей, 47), mudrikovaov@mail.ru*

**Проведен анализ нуклеотидных последовательностей кластера ITS1; 5.8S рРНК; ITS2 для Prunus persica (персик) и Prunus armeniaca (абрикос), выбранных в результате анализа международных геномных баз данных. С использованием методов биоинформатики были сконструированы олигонуклеотидные праймеры и проверены на специфичность. Были проведены экспериментальные исследования по работе сконструированных праймеров на реальных объектах. В работе использовали самостоятельно полученные препараты ДНК персика и абрикоса из свежих фруктов различных сортов, а также в пробах после проведения предварительной термической обработки образцов. Проведена оптимизация параметров проведения полимеразной цепной реакции. Показана возможность использования разработанных олигонуклеотидных праймеров для видовой идентификации персика и абрикоса в термообработанных продуктах методом полимеразной цепной реакции. Полученные последовательности сконструированных праймеров позволяют работать дальше над созданием методики идентификации плодово-ягодного сырья в продуктах питания.**

Ключевые слова: видовая идентификация, ПЦР.

# EXPERIMENTAL STUDY OF FUNDAMENTAL PARAMETERS OF PCR FOR IDENTIFICATION OF SPECIES

**Mudrikova O.V., Arkhipov A.N.**

*Kemerovo Technological Institute of Food Industry, Kemerovo, Russia (650 056, Kemerovo, Boulevard Builders, 47) mudrikovaov@mail.ru*

**The analysis of the nucleotide sequences of the cluster ITS1; 5.8S rRNA; ITS2 for Prunus persica (peach) and Prunus armeniaca (apricot), selected by the analysis of international genomic databases. With the use of bioinformatics methods have been designed oligonucleotide primers and tested for specificity. Experimental studies have been conducted on work designed primers for real-world objects. We used the self-obtained DNA preparations of peach and apricot fresh fruits of different varieties, as well as in the samples after the preliminary heat treatment of the samples. The optimization of the parameters of the polymerase chain reaction. The possibility of using designed oligonucleotide primers for species identification of peach and apricot in the heat-treated products of polymerase chain reaction. The obtained sequences of primers designed allow you to work more on the creation of methods of identification of fruit and berries for food.**

Key words: species identification, PCR.

Прогресс в освоении методов ДНК-диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику новых высокочувствительных методик, основанных на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1]. Суть метода заключается в многократном копировании определенного участка ДНК, ответственного за видовую идентификацию. Увеличение концентрации такого участка продолжается до тех пор, пока его нельзя будет идентифицировать электрофоретическими методами.

Метод полимеразной цепной реакции позволяет из единичных клеток, содержащихся в анализируемом образце, получить необходимое количество ДНК для их идентификации [4]. Традиционно наиболее быстро развиваются пять основных направлений ПЦР-диагностики: диагностка инфекционных заболеваний; диагностика онкологических заболеваний;

диагностика генетических заболеваний; идентификация личности; диагностика патогенов в пище.

По сравнению с традиционными способами видовой детекции установление видовой принадлежности растительного сырья при помощи ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и возможностью количественного анализа. Кроме того, ДНК более устойчива в условиях технологического процесса, чем традиционно используемые низкомолекулярные маркеры [3]. Несмотря на то что использование метода ПЦР для видовой идентификации тканей растительного происхождения получило высокую оценку зарубежных специалистов, в нашей стране это направление не нашло еще широкого практического применения в области санитарной экспертизы.

**Цель исследования.** Провести видовую идентификацию персика и абрикоса методом полимеразной цепной реакции для разработки методики идентификации данных фруктов в продуктах питания и другой продукции на растительной основе.

**Материалы и методы исследования**

Поиск нуклеотидных последовательностей генома Prunus persica (персик) и Prunus armeniaca (абрикос) проводили по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США и EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории.

Кластер ITS1; 5.8S рРНК; ITS2 содержит наибольшее количество нуклеотидных остатков гуанина и цитозина. Это означает, что данная область обладает высокой температурой плавления и при технологической тепловой обработке данная ДНК-мишень будет сохраняться в продукте.

Сам ген состоит из 120 п.н. и связан со спейсерами различных размеров. Последовательность 120 п.н. 5S-рРНК сохраняется внутри вида, а NTS-области кластеров изменяются от вида к виду и имеют различную длину в диапазоне от 100 до 800 п.н., так как они, видимо, находятся не под жестким давлением отбора, в кодирующей области [2]. Высокий уровень сохранности 5S-РНК гена связан с функцией 5S-РНК, как составной части большой рибосомальной субъединицы во всех эукариотических организмах. В некоторых регионах ген более консервативен, чем другие, что объясняется регулированием 5S-рРНК транскрипции [5].

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на вариабельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров, проводили online с помощью системы ClustalW Multi Sequnce Alignment. Ниже представлены нуклеотидные

последовательности Prunus persica (персик) и Prunus armeniaca (абрикос), выбранные для дальнейшей работы.

>seq"Prunus persica ITS1; 5.8S рРНК; ITS2" (AF143535)

1 tcgaaacctg cctagcagaa cgacccgaga actagtttca aagcgggggg cgaggggccc
61 tgcggctcct tgtccccttt atcccggggg ggttgcgctg cgctcgcgcg gccgaccctt
121 ccgggcgtac aaacgaacac cggcgcgaat tgcgccaagg aaattgaacg agagagcgcg
181 tcgtccccgt cgccccggaa acggtgttcg cgggcggcgt cgtcatcttc aaatatgtca
241 aaacgactct cggcaacgga tatctcggct ctcgcatcga tgaagaacgt agcgaaatgc
301 gatacttggt gtgaattgca gaatcccgtg aaccatcgag tctttgaacg gaagttgcgc
361 ccgaagccat taggccgagg gcacgcctgc ctgggcgtca cacgccgttg cccccccatc
421 tactccttcg gggatttcgg gggggcggat gatggcctcc cgtgcgcctc gccgcgcggt
481 tggaataaat accaagtcct cggcgacgca cgccacgaca atcggtggtt gcgaaacctc
541 ggttgcccgt cgtgtgcgtt cgtcgcgcat cgagggctcg aaaaaatgct cggctccggc
601 tcggctttca acgcgacccc aggtcaggcg gggttacccg ctgaa

>seq"Prunus armeniaca ITS1; 5.8S рРНК; ITS2" (EF211084)

1 tcgaaacctg cctagcagaa cgacccgaga actagtttca aagcggggga cgaggggccg
61 tctcggcgtg ctcctcgtcc ctttatcccg ggggggttca tacccttccg ggcgtacaaa
121 cgaacaccgg cgcgaattgc gccaaggaac ttgaacgaga gagcgcgtcc ccgtcgcccc
181 ggaaacggtg tgcgcgggcg gcgtcgtcat cttcaaatat gtcaaaacga ctctcggcaa
241 cggatatctc ggctctcgca tcgatgaaga acgtagcgaa atgcgatact tggtgtgaat
301 tgcagaatcc cgtgaaccat cgagtctttg aacgcaagtt gcgcccgaag ccattaggcc
361 gagggcacgc ctgcctgggc gtcacacgtc gttgccccccc catctactcc ttcgggattg
421 cgggggggcgg atgatggcct cccgtgcgcc ttgtcgcgcg gttggcataa atgccaagtc
481 ctcggcgacg cacgccacga caatcggtgg ttgcgaaacc tcggttgccc gtcgtgtgcg
541 gtcgtcgcgc atcgagggct cgaaaaaatt gccgggctcc ggctcggctt tcaacg

На рисунке 1 приведено выравнивание олигонуклеотидных последовательностей кластера ITS1; 5,8S рРНК; ITS2 персика и абрикоса. Так как проведенные ранее исследования указывают на сложность определения персика в термообработанных продуктах, было принято решение разработать две пары праймеров для отдельной идентификации абрикоса и персика. Цветом на рисунке 1 выделены консервативные участки, выбранные для присоединения праймеров.

Сконструированные праймеры представлены в таблице 1.

**Таблица 1 – Характеристики праймеров для идентификации персика и абрикоса**

| Название праймеров | Нуклеотидная последовательность праймеров | Длина ПЦР-продукта | Температура отжига, °С |
|---|---|---|---|
| Pa319F | AGT TCA TAC CCT TCC GGG CGT | 380 п.н | 63,0 |
| Pa319R | GCA TTT TAT GCC AAC CGC GCG ACA A | | 67,0 |
| Pp289F | GAA CGA GAG AGC GCG TCG TC | 339 п.н | 65,0 |
| Pp289R | GCC GAG GAC TTG GTA TTT ATT CCA A | | 64,0 |

Температуру отжига праймеров определяли с помощью программного продукта http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html.

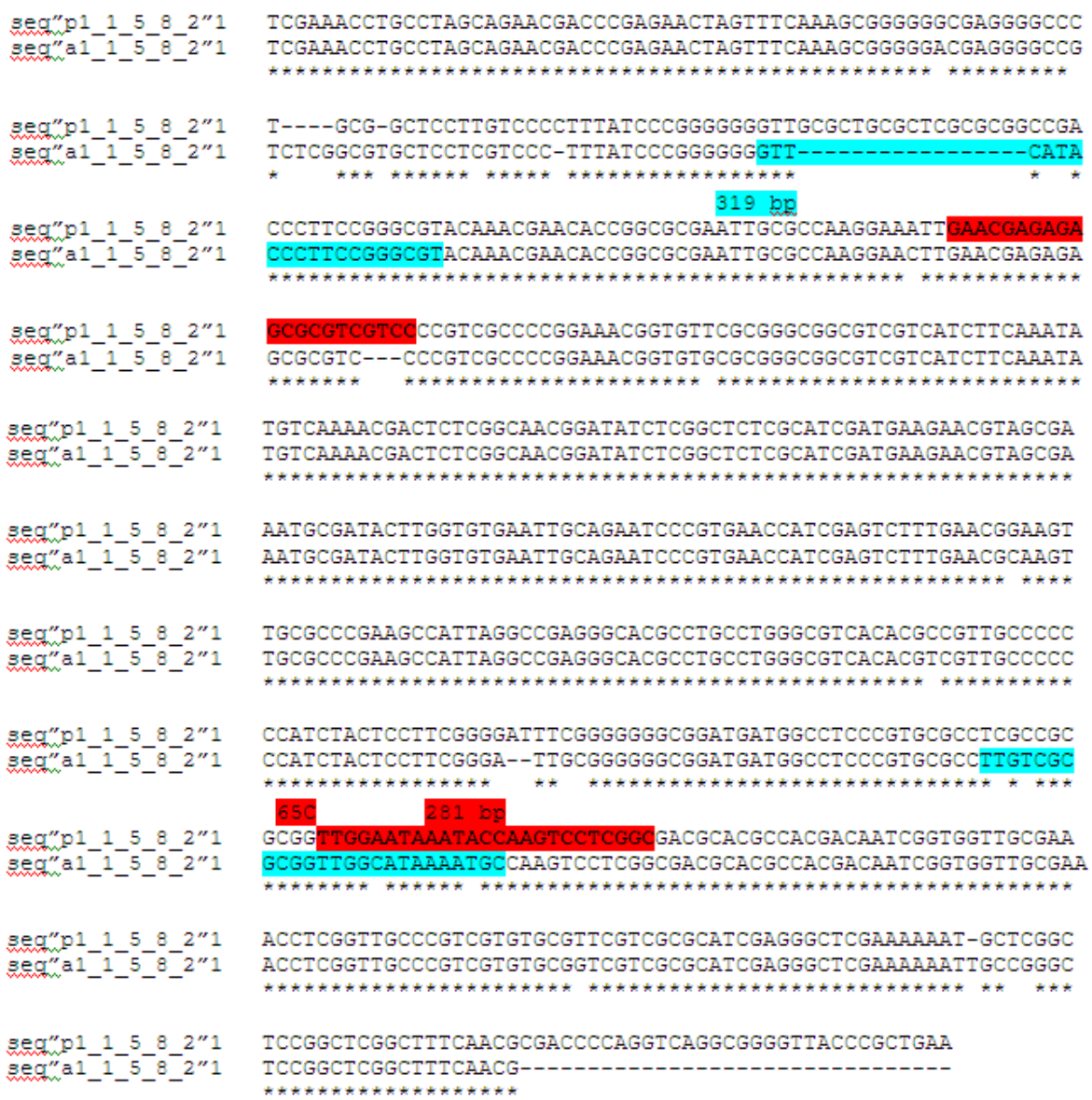


**Рис. 1. Выравнивание олигонуклеотидных последовательностей кластера ITS1; 5,8S рРНК; ITS2 персика и абрикоса.**

Все праймеры были проверены на специфичность с помощью программного продукта AliBee – Multiple Alignment, которая находится на сайте http://www.belozersky.msu.ru в свободном доступе. Эта программа позволяет сравнить последовательности сконструированных праймеров с геномной базой данных. После сравнения всех нуклеотидных последовательностей программа выдает список организмов, с которыми праймеры начнут работу в первую очередь.

В работе использовали самостоятельно полученные препараты ДНК персика и абрикоса из свежих фруктов, а также в пробах после проведения предварительной термической обработки образцов. Термическую обработку проводили двумя способами: образцы свежих фруктов подвергались варке при температуре 95 ºС в течение часа и сушке в сушильном шкафу при температуре 120 ºС в течение 2 часов, для имитации процессов, происходящих с растительным сырьем в процессе технологической обработки.

Праймеры были синтезированы в научно-производственной компании ЗАО «Синтол» (Москва).

Выделение растительной ДНК из образцов проводили с помощью набора реагентов «Сорб-ГМО-А», он основан на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот на частицах магнитов сорбента, что позволяет быстро (за счет сокращения времени центрифугирования) производить выделение ДНК высокого качества с минимальными потерями. Продолжительность выделения составляет около одного часа. Полученные препараты можно сразу использовать для ПЦР без определения концентрации ДНК в них и дополнительного разбавления.

Эксперимент проводили по схеме, представленной в таблице 2. Реакцию амплификации проводили в объеме 29,5 мкл в реакционном буфере следующего состава: праймеры, 2,5х реакционная смесь (содержащая KCl, ТрисHCl (pH 8,8), глицерол, Tween 20, дезоксинуклеозидтрифосфаты, $MgCl_2$.), Taq Днк-полимераза 5 Е/мкл с ингибирующими активность фермента антителами, деионизованная вода, $MgCl_2$.

Анализ полученных электрофореграмм свидетельствует о том, что наилучшие результаты получаются, если проводить амплификацию при концентрации праймеров 100 пкмоль по программе PRAIME.

На рисунке 2 представлены электрофореграммы продуктов амплификации, полученные с помощью пары праймеров Pa319F-Pa319R для абрикоса. Анализ данных электрофореграмм указывает на то, что термическая обработка не влияет на видовую идентификацию абрикоса.

**Таблица 2 – Схема проведения исследования при использовании праймеров различной концентрации**

| Наименование параметров | 1 вариант | | 2 вариант | | 3 вариант | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Объем праймеров, мкл | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Количество праймеров, пкмоль | 10 | 100 | 10 | 100 | 10 | 100 |
| Режим амплификации | 95 °C, 300 сек<br>65 °C, 50 сек<br>95 °C, 15 сек<br>35 циклов | | 95 °C, 300 сек<br>62 °C, 50 сек<br>95 °C, 15 сек<br>35 циклов | | 95 °C, 300 сек<br>64 °C, 50 сек<br>95 °C, 20 сек<br>35 циклов | |
| Название программы | PCR.65 | | PCR/RV | | PRAIME | |

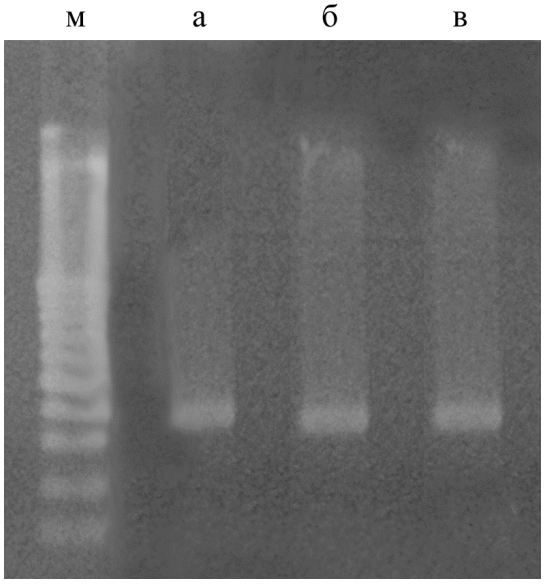


**Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации, полученных с помощью пары праймеров Pa319F-Pa319R:** м – маркер; а – абрикос; б – вареный абрикос; в – высушенный абрикос.

В каждой дорожке с образцами свежего, вареного и высушенного абрикоса наблюдаются продукты амплификации величиной около 350 п.н. Такое изменение размера продукта реакции по сравнению с предполагаемым (380 п.н.) связано с погрешностями при проведении секвенирования образцов и соответствует литературным данным.

На рисунке 3 представлены электрофореграммы продуктов амплификации, полученные с помощью пары праймеров Pp289F-Pp289R для персика. Анализ данных электрофореграмм указывает на то, что термическая обработка не влияет на видовую идентификацию персика. В каждой дорожке с образцами свежего персика, вареного персика и высушенного наблюдаются продукты амплификации величиной около 310 п.н. вместо предполагаемых 339 п.н.

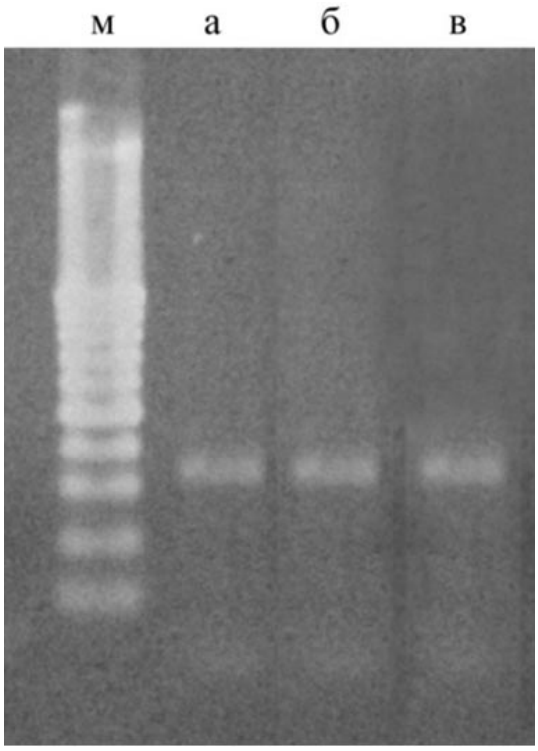


**Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации, полученные с помощью пары праймеров Pp289F-Pp289R:** где м – маркер; а – персик; б – вареный персик; в – высушенный персик.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Анализ полученных данных указывает на высокую специфичность разработанных праймеров. Поскольку в случае персика продукт амплификации имеет размер около 310 п.н., а в случае абрикоса – 350 п.н., разность в размерах амплифицируемых фрагментов позволяет проводит идентификацию двух видов фруктов при одновременном присутствии в пробе по отличию в величине амплифицируемого фрагмента.

**Заключение**

В результате проведенных исследований впервые показана возможность определения персика в термообработанных образцах. Указана важность в разнице величин амплифицируемых фрагментов при работе сконструированных праймеров с образцами персика и абрикоса.

Полученные нуклеотидные последовательности сконструированных праймеров позволяют работать дальше над созданием методики идентификации плодово-ягодного сырья в продуктах питания.

**Список литературы**

1. Сингер М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М. : Мир, 1998. – Т. 1. – 392 с.

2. Fruit-based functional foods II: the process for identifying potential ingredients / D.C. Hunter, J. Zhang, L.M. Stevenson et al. // Int. J. Food Sci.Technol. – 2008. – № 43. – P. 2123-2129.

3. Marmiroli N. Advanced PCR techniques in identifying 369 food components. in food authenticity and traceability / N. Marmiroli, C. Peano, E. Maestri, M. Lees, Eds. // CRC Press: Cambridge U.K. – 2003. – P. 3-33.

4. Negi M.S. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides* / M.S. Negi, J. Rajagopal, N. Chauhan et al. // Genome. – 2002. – Vol. 45. – № 6. – P. 1181-1188.

5. Phylogenetic reconstruction of the genus *Kluyveromyces* : restriction map analysis of the 5.8s rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers / C. Belloch, E. Barrio, M.D. Garcia et al. // Syst Appl Microbiol. – 1998. – V. 21. – P. 266-273.

***Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» ГК № 14.740.11.1219.***

**Рецензенты**

Просеков А.Ю., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Бионанотехнология», ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово.

Жарков Д.О., д.б.н., доцент, зав. группой Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.