

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

Методические указания по выполнению самостоятельной и контрольной
работ

\

Новосибирск 2022

УДК 619:614.31
ББК 48
С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

Составитель: Себежко О.И., к.б.н., доц.

Рецензент: Гудков С.Н, к.б.н., доц. кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы и паразитологии НГАУ

Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе: метод. указания по выполнению самост. и контр. работ/ сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос.аграр. ун-т.– Новосибирск, 2022. –94 с.

Методические рекомендации предназначены для студентов-магистров студентов факультета ветеринарной медицины по направлению подготовки 36.04.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза».

Изложены основные вопросы курса «Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе», для самостоятельного изучения и вопросы для контрольной работы. Приведены глоссарий, библиографический список, тесты и вопросы для контроля.

Введение

Молекулярно-генетические методы являются неотъемлемой частью многих современных ветеринарно-санитарных исследований.

Данные методы предназначены для выявления вариаций в структуре исследуемого участка ДНК (аллеля, гена, региона хромосомы) вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований.

Главным достоинством молекулярно-генетических методов исследования является минимальная степень ветеринарного вмешательства, так как данное исследование проводят *in vitro*.

Молекулярно-генетическая диагностика — это группа сравнительно новых методов, которые позволяют точно и быстро выявить вирусы и бактерии, иные патогены, мутации генов, вызывающих патологию, нарушения производственных процессов, а также оценить риски возникновения и развития инфекционных заболеваний у животных.

Целью методических указаний по изучению курса «Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе» является обеспечение эффективности самостоятельной работы студентов-магистров на основе усвоения материала курса лекций, подготовки к семинарским занятиям, написания контрольных работ и работы с литературой.

Задачи настоящих методических указаний по изучению дисциплины включают:

- активизацию самостоятельной работы студентов-магистров;
- выработку умений и навыков рациональной работы с литературой;
- обеспечение контроля за ходом самостоятельной работы студентов-магистров и ее результатами;
- управление познавательной деятельностью студентов-магистров.

Задача курса учебной дисциплины «Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе» – дать знания по данной дисциплине и обеспечить формирование у студентов-магистров представлений о современных молекулярно-генетических методах исследований, применяемых в ветеринарно-санитарной экспертизе.

В результате изучения дисциплины студенты-магистры приобретают знания и умения в данной области и могут применять их на практике.

Структура и трудоемкость дисциплины «Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе»

Курс «Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе» изучается в течение одного семестра на втором курсе магистратуры. Объем дисциплины и виды учебной работы по курсу приведены в таблице.

Вид занятий	Объем занятий [зачетных ед./часов]			Семестр
	очная	заочная	очно-заочная	
Общая трудоемкость по учебному плану	3/ 108			3
В том числе,				
<i>Контактная работа</i>	26			
Занятия лекционного типа	6			
Занятия семинарского типа	20			
<i>Самостоятельная работа, всего</i>	82			
В том числе:				
Контрольная работа	К.р.			3
Форма контроля	зачет			3

Учебной программой дисциплины «Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе» предусмотрено 75,93 % объема времени отводить на самостоятельную работу студентов. Данный вид работы является обязательным.

При самостоятельном выполнении различных видов заданий студенты-магистры учатся самостоятельно принимать решения, разбирать и изучать новый материал, работать с периодической научной литературой.

Самостоятельная работа по курсу «Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе» включает:

- самостоятельное изучение теоретического материала с использованием рекомендуемой литературы;
- подготовку к практическим занятиям;
- написание и защиту контрольной работы;
- самотестирование;
- подготовку к зачету.

По каждому виду работы магистрант должен выполнить задания, приведенные в настоящих методических указаниях и согласованные с преподавателем. Выполненные задания оформляются в соответствии с требованиями оформления студенческих текстовых документов и сдаются преподавателю в соответствии с графиком самостоятельной работы.

Для аттестации студентов по дисциплине используется традиционная система контроля и оценки успеваемости обучающихся.

Раздел 1. Молекулярно – генетические методы диагностики

В одном из сентябрьских номеров 1998 года авторитетное издание «The New York Times» опубликовало примечательную статью под заголовком «Scientist at Work / Kary Mullis; After the 'Eureka,' a Nobel Prize Drops Out». Статья была посвящена пятилетию вручения Нобелевской премии американскому биохимику Кэри Муллису (Kary Banks Mullis; 28.12.1944 — 07.08.2019). Не вдаваясь в детали публикации, хочется обратить внимание на характеристику, данную инновации автором: «Его изобретение высоко оригинально и значимо, оно фактически разделило биологию на две эпохи: до ПЦР и после ПЦР»¹ (перев. — В.А.Н.). Трудно себе представить, что после разработки эволюционной теории Ч. Р. Дарвином и открытием законов наследственности Г. И. Менделем в биологии могло произойти что-то не менее грандиозное, способное стать рубежной линией в развитии науки. Изобретение ПЦР (полимеразной цепной реакции) само по себе не обогатило нас новыми знаниями и не подвело теоретическую основу под уже имеющиеся массивы данных, но открыло доселе недостижимые практические возможности для исследований в различных медико-биологических направлениях. За прошедшие десятилетия ПЦР-исследования настолько прочно вошли в обиход прикладной медицины, что стали одним из незаменимых диагностических методов. Зачастую – едва ли не единственным. Область применения ПЦР-диагностики охватывает широкий спектр исследований от выявления возбудителей инфекционных заболеваний человека до установления генетических причин наследственных и мультифакториальных болезней и идентификации личности в судебной медицине [1–7]. Существует достаточно много учебной и специальной литературы, рассматривающей различные аспекты молекулярно-генетических исследований. Она ориентирована, прежде всего, на подготовленных читателей. Предлагаемый цикл лекций предназначен для учащихся медико-биологических направлений и специалистов, имеющих базовые знания в области биологии. Задача автора –

лаконично и без излишней детализации изложить основные концепции и принципы, положенные в основу молекулярно-генетических исследований, осветить важнейшие научно-практические направления их применения, получившие реальное воплощение в повседневной деятельности работника здравоохранения. Следует оговориться, что молекулярно-генетические исследования в широком смысле подразумевают использование разнообразных и зачастую чрезвычайно сложных методов изучения генетического материала живых объектов. Далеко не все они стали рутинными и практически значимыми. Так, секвенирование нуклеиновых кислот (НК) чрезвычайно важно для установления нуклеотидной структуры ДНК и РНК и может быть использовано в медицинской практике, например, для выявления новых мутаций, ассоциированных с заболеваниями человека. При этом применение секвенирования для массовой диагностики таких мутаций делает процедуру длительной и/или дорогостоящей [8]. Полимеразная цепная реакция также подразумевает манипуляции с нуклеиновыми кислотами. Однако в данном случае исследователь обычно ограничивается идентификацией специфического участка генома без детального его изучения, что обеспечивает необходимую скорость выполнения анализа в сочетании с простотой и низкой себестоимостью. При этом технологический уровень лабораторного оборудования и требуемая квалификация персонала таковы, что ПЦР-диагностика может быть успешно развернута на базе любого медицинского, образовательного или исследовательского учреждения. События, связанные с пандемией коронавирусной инфекции COVID-19, в очередной раз показали, что потенциал использования молекулярно-генетической диагностики в медицине далек от исчерпания. Более того, как и в ряде предшествовавших инцидентов, именно ПЦР-диагностика становится «золотым стандартом» при выявлении патогенных микроорганизмов, несмотря на наличие ряда альтернативных исследовательских методов [9–11]. Биологические источники и методы получения нуклеиновых кислот для ПЦР-диагностики Одним из наименее технологичных, но чрезвычайно важных

этапов молекулярно-генетического исследования является получение препаратов нуклеиновых кислот из биологических образцов. К настоящему времени разработаны методики выделения НК практически из любых материалов – от свежих фрагментов тканей до фиксированных препаратов и высушенных образцов. Столь же разнообразны и сами способы экстракции НК. Вне зависимости от типа используемого материала универсальным является этап разрушения (лизиса) клеток и клеточных ядер для высвобождения в раствор нуклеиновых кислот. Для этой цели используют мощные детергенты, разрушающие липидный компонент биомембран (например, додецилсульфат натрия), и денатурирующие вещества для дезактивации мембранных и цитоплазматических белков (например, гуанидин тиоцианат). Дальнейшие манипуляции при выделении НК определяются текущими требованиями к скорости выполнения методики и качеству получаемого препарата. Классическая хлороформ-фенольная экстракция, до сих пор используемая в большинстве научных лабораторий, позволяет получить продукт с высокой концентрацией и степенью очистки НК от примесей. При этом большое количество манипуляций увеличивает длительность процедуры и вероятность загрязнения (контаминации) конечного продукта посторонними веществами, в том числе нуклеиновыми кислотами, из других образцов и окружающей среды. Использование летучих и токсичных веществ делает процедуру небезопасной для оператора.

Термокоагуляционная экстракция, объединяющая ряд так называемых «экспресс-методов», фактически ограничивается стадией термического лизиса исходного образца и осаждением коагулирующих примесей в присутствии вспомогательных реагентов. Преимущества метода – простота и высокая скорость исполнения, что определяется минимумом манипуляций и снижает вероятность контаминации образца. При этом конечный раствор содержит помимо НК различные продукты распада клеток, а также компоненты реакционной смеси. Некоторые из этих веществ являются потенциальными

ингибиторами ПЦР, что может повлиять на результат дальнейшего исследования. Сорбентная экстракция основана на явлении избирательного осаждения нуклеиновых кислот на частицах диоксида кремния, что облегчает удаление прочих примесей в ходе дальнейшей промывки образца. При высоком качестве получаемого продукта выполняется условие безопасности процедуры для оператора и окружающей среды благодаря отсутствию в протоколе токсичных веществ. Недостатки методики (значительное количество манипуляций и сопутствующие этому длительность процедуры и высокая вероятность контаминации) в настоящее время удалось преодолеть путем разработки автоматических станций для выделения НК. Нуклеиновые кислоты – объект изучения при молекулярно-генетическом исследовании. Как следует из определения, молекулярно-генетические исследования подразумевают изучение генетических свойств биологического объекта на молекулярном уровне. Альтернативное название – «генодиагностика» указывает на возможность идентификации и исследования с помощью данных методов отдельных генов (а так тельных реагентов. Преимущества метода – простота и высокая скорость исполнения, что определяется минимумом манипуляций и снижает вероятность контаминации образца. При этом конечный раствор содержит помимо НК различные продукты распада клеток, а также компоненты реакционной смеси. Некоторые из этих веществ являются потенциальными ингибиторами ПЦР, что может повлиять на результат дальнейшего исследования. Сорбентная экстракция основана на явлении избирательного осаждения нуклеиновых кислот на частицах диоксида кремния, что облегчает удаление прочих примесей в ходе дальнейшей промывки образца. При высоком качестве получаемого продукта выполняется условие безопасности процедуры для оператора и окружающей среды благодаря отсутствию в протоколе токсичных веществ. Недостатки методики (значительное количество манипуляций и сопутствующие этому длительность процедуры и высокая вероятность контаминации) в настоящее время удалось преодолеть путем разработки автоматических станций для выделения НК.

Нуклеиновые кислоты – объект изучения при молекулярно-генетическом исследовании. Как следует из определения, молекулярно-генетические исследования подразумевают изучение генетических свойств биологического объекта на молекулярном уровне. Альтернативное название – «генодиагностика» указывает на возможность идентификации и исследования с помощью данных методов отдельных генов (а так как ДНК, так и РНК, являются полинуклеотидами. Каждый нуклеотид, в свою очередь, состоит из трех частей: циклического моносахарида-пентозы (дезоксирибозы или рибозы); азотистого основания, присоединенного к 1'-атому углерода пентозы, и остатка фосфорной кислоты, присоединенного к 5'-атому углерода пентозы. Взаимодействие между нуклеотидами в одной цепи НК осуществляется путем образования фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатом предшествующего нуклеотида и одной из ОН-групп пентозы (3'-ОН группой) следующего нуклеотида. Очевидно, что крайние нуклеотиды одной цепи будут нести либо свободную 5'-Ф группу (это 5'-конец НК), либо свободную 3'-ОН группу (это 3'-конец НК). В отличие от РНК, ДНК образует регулярную двунитевую структуру, образованную антипараллельными полинуклеотидными нитями таким образом, что 5'-конец одной из них располагается напротив 3'-конца другой. Такая конфигурация позволяет компенсировать естественную «скошенность» каждой из нитей ДНК при их сближении, но даже и в этом случае для повышения стабильности ДНК вынуждена принять структуру спирали. При максимальном сближении двух нитей ДНК становится возможным формирование поперечных водородных связей между азотистыми основаниями противоположащих участков. Хотя единичная водородная связь является слабой, большое их количество способно прочно удерживать вместе комплементарные нити ДНК. Обязательным условием эффективного взаимодействия двух цепей является комплементарность оснований. Несоответствие оснований – «мисматч» (от англ. mismatch – несоответствие), возникающее например, вследствие мутаций, приводит к локальному снижению стабильности двунитевой

структуры. ПЦР как модель естественного механизма репликации ДНК *in vitro*

Строго говоря, ПЦР не является «изобретением», скорее, это «открытие» природного механизма репликации ДНК, который позднее удалось реализовать вне клетки. В естественных условиях для удвоения ДНК включается целый ансамбль клеточных ферментов и вспомогательных веществ. Прежде всего, двунитевая ДНК должна быть разделена на одиночные нити, что осуществляется хеликазой. В дальнейшем одиночные нити поддерживаются в свободном состоянии дестабилизирующими белками. В это же время в области расплетения ДНК (репликационная вилка) другой фермент – праймаза на одонитевой ДНК-матрице синтезирует короткую олигонуклеотидную затравку (праймер) для будущей дочерней цепи. ДНК-полимераза распознает свободную 3'-ОН группу праймера и начинает последовательно присоединять к ней нуклеотиды, комплементарные матрице.

Предшественниками нуклеотидов являются дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ) четырех типов (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ), которые одновременно являются и строительным материалом для дочерней цепи, и макроэргами благодаря наличию в своем составе трех фосфатных групп. Направление синтеза дочерней цепи ДНК всегда одно – от 5'-конца к 3'-концу. Для синтеза лидирующей цепи достаточно одного праймера, она образуется непрерывно, следуя за хеликазой. Для построения отстающей цепи требуется множество праймеров, поэтому она синтезируется в виде фрагментов Оказаки, которые позднее будут соединены вместе еще одним ферментом – ДНК-лигазой. В ходе ПЦР также осуществляется процесс репликации НК, однако он повторяется многократно, приводит к образованию многочисленных копий целевого участка и потому называется амплификацией. Для генодиагностики обычно выбирается один или несколько относительно коротких участков НК, а не весь геном. В систему вводятся искусственные праймеры, комплементарные концам изучаемой области, что автоматически ограничивает участок амплификации (рисунок 3). При этом отпадает необходимость в праймазе. Становится очевидным, что для

разработки любой ПЦР-системы необходимы знания о нуклеотидной последовательности НК-мишени. По этой причине созданию протокола для ПЦР предшествует секвенирование, по крайней мере, концевых частей области НК, которую предполагается амплифицировать. В искусственных условиях довольно сложно обеспечить условия для согласованной работы всех элементов клеточного репликационного ансамбля, поэтому основной задачей при создании ПЦР стало упрощение системы с сохранением ее работоспособности и эффективности. Установлено, что ДНК можно многократно нагревать до температуры более 900 С, что приводит к разрушению водородных связей и разделению нитей (денатурация, или плавление). Последующее охлаждение сопровождается восстановлением двунитевой спирали (ренатурация). Контролируемое нагревание-охлаждение системы позволяет избавиться от хеликазы и дестабилизирующих белков на стадии образования одонитевой матрицы. Однако остается еще один элемент системы, заменить или устранить который невозможно, – это ДНК-полимераза. В условиях постоянного нагревания этот фермент будет подвергаться тепловой денатурации и «выключать» ПЦР. Прошло достаточно много времени с момента открытия ПЦР, прежде чем ученым удалось обнаружить в природе и научиться получать в достаточном количестве термостабильную ДНК-полимеразу. В настоящее время большинство протоколов ПЦР основаны на использовании ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* – Таq-полимеразы, проявляющей максимальную активность при температуре более 700 С и относительно стабильную при более высоких температурах. Таким образом, стандартная ПЦР-система включает единственный фермент – Таqполимеразу или аналогичный, помещенный в буфер с оптимальными физико-химическими свойствами. Пара искусственных праймеров обеспечивает узнавание и амплификацию специфического участка НК, а дНТФ, как и в клеточной системе, служат материалом будущих копий НК-мишени. ПЦР является циклическим процессом. На первом этапе система нагревается до

температуры плавления ДНК для образования однострессовой матрицы. Затем ПЦР-смесь охлаждается до 50– 600 С. На этом этапе становится возможным формирование водородных связей и присоединение (отжиг) праймеров к комплементарным участкам ДНК. Наконец, на стадии элонгации при температуре около 700 С Taq-полимераза наращивает праймеры до более длинных полинуклеотидов в направлении 5'→ 3'. При этом расходуются присутствующие в системе дНТФ. Продукты амплификации называются ампликонами. В ходе первого цикла ПЦР образуются «длинные» ампликоны, превышающие длину изучаемого участка. Это объясняется отсутствием ограничителя для работы Taq-полимеразы в области образующегося 3'-конца ампликона. В последующих циклах, которые включают те же стадии, что и первый, «длинные» ампликоны, наряду с исходной ДНК, сами становятся матрицами для амплификации. При этом уже со второго цикла в системе появляются «короткие» ампликоны, соответствующие по длине изучаемому участку ДНК. Именно они в дальнейшем будут накапливаться экспоненциально, обеспечивая «цепной» характер ПЦР. Остается добавить, что весь процесс ПЦР осуществляется без участия человека. Предварительно подготовленная в микропробирке ПЦР-смесь с внесенным раствором НК (или без нее – на данном этапе это может быть не известно) помещается в амплификатор (термоциклер). Амплификатор по заданной программе осуществляет циклическое изменение температурного режима на протяжении 30-40 циклов, при этом в системе накапливается достаточное для идентификации и исследования количество ампликонов. Современные форматы ПЦР обладают чрезвычайно высокой чувствительностью и способны успешно амплифицировать даже единичные копии исходной НК. Однако коммерческие тест-системы, предназначенные для выявления патогенных микроорганизмов, обычно обладают аналитической чувствительностью от 1000 копий НК в 1 мл исходного клинического образца. Анализ результата ПЦР – этап детекции Проведение ПЦР в рамках генодиагностики означает выполнение ключевого, но не завершающего этапа исследования. В ходе

процесса в реакционной смеси не происходит видимых изменений, свидетельствующих о накоплении ампликонов. С другой стороны, ампликоны (а также неизрасходованные праймеры) аналогичны небольшим фрагментам двунитевой ДНК, которая могла присутствовать в растворе с момента приготовления смеси. Например, при выявлении микроорганизмов в исходном биологическом образце всегда присутствуют и клетки носителя – человека. На стадии выделения нуклеиновых кислот ДНК человека экстрагируется наряду с НК паразита и неизбежно оказывается в ПЦР-смеси. Таким образом, после проведения ПЦР заключительной задачей является отличить образовавшиеся целевые ампликоны от прочих НК, что и обозначается термином «детекция». Исторически наиболее ранним и все еще распространенным способом детекции является электрофоретическое разделение НК. Оно базируется на двух основных принципах. Во-первых, НК обладают отрицательным зарядом (за счет фосфатных групп) и потому способны в постоянном электрическом поле двигаться в сторону анода. Во-вторых, подвижность НК в электрическом поле обратно пропорциональна длине (или массе) фрагмента НК. Электрофорез проводят в полужидкой среде (геле) с агарозой или полиакриламидом в качестве связующего вещества, их концентрация подбирается с учетом предполагаемого размера ампликонов и должна обеспечивать хорошие сортирующие свойства геля. Результат электрофоретического разделения НК оценивается визуально, поэтому необходимо специфическое окрашивание этих макромолекул. Традиционно нуклеиновые кислоты идентифицируют с помощью интеркалирующих красителей, способных связываться почти исключительно с ними за счет встраивания между нуклеотидами параллельно плоскости азотистых оснований. Наиболее распространенными интеркалирующими красителями являются бромистый этидий и SYBR Green, в комплексе с ДНК они дают соответственно красно-оранжевую и зеленую флуоресценцию при УФ-возбуждении. Краситель обычно вводится в состав электрофоретического геля на стадии его приготовления. В процессе движения НК не только разделяются

по размеру, но и связываются с красителем. Визуализация результата разделения происходит после завершения процесса путем помещением пластинки геля на трансиллюминатор, содержащий УФ-облучатель. Геномная ДНК обладает достаточно большим размером, чтобы задержаться в стартовых ячейках и обладает небольшой подвижностью (рисунок 4). При наличии в составе исходного образца ДНК-мишени, комплементарной праймерам, продуктом ПЦР становятся ампликоны. Яркость полос ампликонов на электрофореграмме обычно пропорциональна концентрации исходных ДНК-матриц, но для точной количественной оценки этого параметра используются альтернативные методы анализа, например ПЦР с детекцией «в реальном времени». Наконец, праймеры также способны связываться с красителем и выявляются как фракция наиболее коротких и наиболее подвижных ДНК-фрагментов. Завершая анализ теоретических основ проведения генодиагностики, основанной на ПЦР, можно заключить, что данная группа методов направлена, прежде всего, на выявлении искомой последовательности в ДНК или РНК. Для осуществления исследования необходимы знания о нуклеотидном составе данной НК-мишени, на основании которых разрабатываются праймеры для осуществления собственно ПЦР. При ПЦР-амплификации происходит размножение данного участка с использованием в качестве матрицы минимального количества НК, что определяется «цепным» характером ПЦР. При этом достигается высокая специфичность реакции за счет избирательного связывания праймеров с уникальными участками мишени. Идентификация ампликонов в ПЦР-смеси является завершающей стадией генодиагностики. Причем современные модификации ПЦР-анализа позволяют провести как качественный анализ образца с целью выяснения наличия или отсутствия искомой НК, так и количественный анализ для установления ее концентрации.

Раздел 2. Видовая идентификация

В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Методы исследования белков включают в себя иммунологические, электрофоретические и хроматографические. Анализ молекул ДНК применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью их структуры по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей. В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Методы исследования белков включают в себя иммунологические, электрофоретические и хроматографические. Анализ молекул ДНК применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью их структуры по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей. В результате исследований в качестве основного метода выбран метод ПЦР в реальном времени (real time PCR), обладающий надежностью, высокой чувствительностью, достаточной экспрессностью, с возможностью его использования для молочных многокомпонентных продуктов со сложной структурной матрицей, а также для продуктов, прошедших глубокую технологическую обработку.

В последнее время маркировка продукции имеет решающее значение для осведомленности потребителя о составе пищевой продукции. Неверно указанная информация о составе продукта или его свойствах, а также заведомо ложная информация о наименовании товара и его компонентах может привести к негативным последствиям в отношении здоровья потребителей. Это может быть связано, например, с наличием пищевой аллергии на определенные компоненты животного и растительного происхождения, входящие в состав продукции. Данные обстоятельства подтверждают

необходимость проведения исследований состава продукта с применением молекулярно-генетических методов анализа на предмет идентификации и отсутствия незаявленных компонентов, таких как аллергены, ГМО и прочие возможные составляющие пищевой продукции. В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Применяемые методы исследования белков включают в себя иммунологические (Haza et al., 1999), электрофоретические и хроматографические методы (Ferreira et al., 2003). Анализ молекул ДНК применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью структуры молекул ДНК по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей, что делает анализ молекул ДНК для идентификации компонентов в продуктах питания хорошей альтернативой анализу состава белков (Gachet et al., 1999). Методы, основанные на анализе ДНК, в большинстве своем состоят из специфических амплификаций одного или нескольких фрагментов ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применение полимеразной цепной реакции имеет широкий потенциал в связи с высокой чувствительностью, быстротой и простотой проведения анализа (Miraglia et al., 2004). Данные особенности метода позволили довольно широко использовать его для анализа микробиологических показателей, когда методы классической микробиологии не позволяют проводить идентификацию на уровне отдельных молекул. Преимущества метода ПЦР анализа кроются в его особенностях, принцип основан на гибридизации и синтезе специфических олигонуклеотидов (праймеров) с последующей детекцией методом гельэлектрофореза на агарозном геле. Применение данного подхода является самым простым способом оценки видовой составляющей компонентов пищевых продуктов (Saiki et al., 1985). Значительное развитие метода ПЦР диагностики привело к разработке методических подходов к их применению. В качестве дополнительных методов подтверждения и анализа фрагментов ДНК могут

быть использованы следующие методы анализа:

- полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP) – способ исследования геномной ДНК путем фрагментирования ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов с использованием метода гель-электрофореза (Lockey et al., 2000);
- однострессовой конформационный полиморфизм (PCR-SSCP) – после денатурации одноцепочечная ДНК претерпевает трехмерное свертывание и может принимать уникальное конформационное состояние на основе своей последовательности ДНК. Различие в форме между двумя одноцепочечными цепями ДНК с разными последовательностями вызывает их различную миграцию на агарозном геле, даже если количество нуклеотидов одинаково;
- случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (PCR-RAPD) – используется как одиночный праймер, так и несколько RAPD-праймеров. Продукт RAPD образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированной инвертированной последовательностью используемого праймера. Метод универсален для исследований разных видов, при использовании одних и тех же праймеров. Как правило, праймер, выявляющий высокий полиморфизм для одного вида, будет эффективен и для других видов (Lockey et al., 2000);
- повторы последовательностей (PCR-SSR) – являются очень эффективным молекулярным маркером в популяционной генетике, картировании генома, таксономических исследованиях и других крупномасштабных исследованиях. Данный способ ПЦР с фланкирующими праймерами к короткому мини- или микросателлитному повтору позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу (Lockey et al., 2000);
- мультиплексная полимеразная цепная реакция (Multiplex PCR) относится к использованию полимеразной цепной реакции для амплификации нескольких различных последовательностей ДНК одновременно. Приведенные выше молекулярно-генетические методы можно разделить на две крупные составляющие: количественный конкурентный ПЦР и ПЦР в реальном

времени (real time PCR) с возможностью использования специальных зондов или меченых праймеров (Zimmermann et al., 1996). ПЦР в реальном времени позволяет проводить одновременное обнаружение и подтверждение выделенных фрагментов, что повышает надежность применения методики измерений для анализа пищевых продуктов. Необходимость в идентификации видового состава молочной продукции явилась отправной точкой к применению методов молекулярно-генетического анализа с последующей разработкой методик измерений, базирующихся на принципах ПЦР диагностики, но с учетом всех достоинств и недостатков метода. В настоящее время методы ПЦР диагностики уже успешно применяются для определения видового состава мясной и рыбной продукции, а также пивоваренной продукции.

Рассматривая потенциал возможности методов ПЦР анализа для исследования состава пищевой продукции было установлено, что посредством ДНК анализа возможно осуществлять контроль аллергенов в пищевой продукции, в продуктах, обладающих потенциальными аллергенными свойствами. ДНК анализ позволяет определять данные компоненты на уровне пикограмм (Poms et al., 2004). Применение видоспецифичной ПЦР используется для выявления фундука в пищевой продукции на уровне 0,001 % (Holzhauser et al., 2000). Также применение ПЦР делает возможным определения аллергенов в сложных пищевых матрицах (Poms et al., 2004). Выявление аллергена арахиса проводится методом ПЦР в реальном времени и позволяет выявлять его наличие на уровне 0,0001 % (Hird et al., 2003). В связи с высокой чувствительностью методы ПЦР все больше используются для обнаружения ДНК продуктов как растительного, так и животного происхождения, и распространяются на все более широкий круг потенциальных аллергенов. Первые методики использования метода ПЦР для анализа ГМО были разработаны на основе количественной конкурентной ПЦР (QC-PCR) и применялись для анализа генно-модифицированной кукурузы и

сои (Hübner et al., 1999). В настоящее время ПЦР в реальном времени является наиболее часто используемой техникой для количественного определения ГМО. Это связано с некоторыми преимуществами метода, в частности сокращение продолжительности анализа и устранение мешающих артефактов за счет отсутствия анализа путем электрофореза в агарозном геле, а также повышенная специфичность за счет возможности использования зондов. Валидация метода ПЦР в реальном времени обеспечивается посредством сертифицированных образцов генно-модифицированных компонентов. В связи с этим для решения данного вопроса разработаны коммерческие наборы, содержащие все необходимые компоненты для проведения анализа по выявлению ГМО в различных пищевых матрицах (Hardegger et al., 1999). Наиболее часто выявляемой фальсификацией, например, в мясной продукции является наличие свиного или куриного мяса в продуктах, выработанных из говядины. Методы полимеразной цепной реакции позволяют проводить количественную оценку внесения компонентов, несущих ДНК свиньи в количестве от 0,1 % и выше. Данный метод за счет своей высокой специфичности позволяет выявлять даже следовые количества свинины. Методы ПЦР применяются и для анализа мясной продукции, прошедшей термическую обработку. Разработанные методики позволяют одновременно определять до четырех видов животных компонентов в составе продукта.

Применение комплекса аналитических методов, основанных на полимеразной цепной реакции, делает возможным проводить аутентификацию мясной продукции по видовому составу с учетом различных вариантов технологической обработки (Meyer et al., 1994; 1995), что позволяет комплексно подойти к решению вопроса идентификации состава. Возможность оценки структуры продукта, прошедшего технологическую обработку с применением метода ПЦР анализа, способствует изучению состава молочной продукции в случае, если сложность матрицы не позволяет применять хроматографические методы. Интересен подход к идентификации

и при исследовании рыбной продукции. Определение видового состава рыбной продукции обычно ведется классическими методами по морфологическим признакам. Но при анализе рыбной продукции с искаженными морфологическими признаками вследствие влияния технологической обработки дать однозначный ответ на видовое происхождение примененных компонентов нельзя. В этом случае для определения состава рыбной продукции используются методы ПЦР

Изучение применяемых методов ПЦР анализа рыбной продукции показало, что большинство основанных на анализе ДНК методов идентификации рыбной продукции построено на усилении митохондриальной ДНК. Для видовой идентификации чаще других используется цитохром Б (Asensio et al., 2001; Calo-Mata et al., 2003; Hold et al., 2001), что позволяет расширять возможности применения методик измерений. Активно используется метод ПЦР диагностики для оценки технологических свойств молока. По данным авторов (Ахметов и др., 2009; Бигаева и др., 2019а; 2019б; Tyulkin et al., 2019), возможно использовать метод молекулярно-генетического анализа для оценки генотипа коров с разными генотипами каппа-казеина и влиянием генотипа каппа-казеина на сыропригодность молока и его технологические свойства. Метод ПЦР анализа для оценки подлинности молочной продукции в настоящее время практически не применяется, в силу того, что возможности данного метода не позволяют оценить состав продукта, который включает не только молоко, но и пищевые ингредиенты и компоненты. Вместе с тем в последнее время ассортиментный ряд молочной продукции значительно расширился, что привело к необходимости более детальной оценки состава продукта, в том числе и с учетом его аллергенности. Также появилась необходимость оценки продукта с точки зрения видового состава сырья. Заявленный продукт, якобы выработанный из козьего молока, далеко не всегда соответствует своему наименованию. Поэтому в настоящее время фальсификацию молочной продукции можно свести к несоответствию

заявленных составных частей продукта или не заявленных видов молокасырья при производстве той или иной молочной продукции. Анализ видовой составляющей молочного сырья необходим при производстве "чистых" продуктов, таких, например, как овечьи или козьи сыры, где достаточно часто встречается использование коровьего молока. Посредством метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) возможно выявление примесей добавленного молока от 0,1 %, что позволяет с высокой точностью определять видовую специфичность даже в условиях "осложненной" различными технологическими факторами матрицы продукта

Разработки в области аутентификации молочной продукции позволили проводить идентификацию четырех видов сельскохозяйственных животных (корова, овца, коза, буйвол), представляющих наибольший интерес в молочной промышленности (Plath et al., 1997). Возможен анализ видовой составляющей молочных продуктов, прошедших технологическую обработку, в том числе и термическую. Так, например, применение метода ПЦР анализа, основанного на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов, позволяет проводить выявление биологического происхождения основного молочного белка казеина, включая казеинаты, используемые в молочной промышленности в качестве ингредиентов (De la Fuente et al., 2005). Оценка применяемых методов ПЦР диагностики позволила разработать методические подходы для идентификации сырьевого происхождения продукта. Определены основные подходы к подготовке пробы с учетом состава продукта и степени его обработки. Для достоверности оценки методических подходов применялись искусственно созданные образцы молока-сырья, представляющие собой молоко коровье, молоко козье и молоко овечье, микс из трех видов молока в различных соотношениях, микс из коровьего и козьего молока в соотношении 98 : 2, микс из козьего и коровьего молока в соотношении 98 : 2. Оценочные результаты показали, что потребуется

разработать основные подходы к возможности использования нескольких методов ПЦР анализа одновременно.

Оценка полученных результатов показала, что наиболее оптимально использовать метод количественной конкурентной ПЦР и ПЦР в реальном времени (real time PCR) в совокупности. Для дальнейшей разработки методики измерений необходимо будет оценить влияние различных факторов, к которым относится технология переработки, включая термическую обработку, процесс сквашивания, состав заквасочной культуры, так как выявленная высокая специфичность метода может приводить к получению ложноположительных результатов. Проведенные исследования позволили оценить возможности метода ПЦР диагностики с учетом дополнительных методов подтверждения и анализа фрагментов ДНК. Полученные оценки используемых методик измерений позволили сделать вывод, что метод ПЦР диагностики имеет высокий потенциал для использования в целях идентификации молочной продукции. В качестве основного метода исследования был выбран метод ПЦР в реальном времени (real time PCR), который обладает необходимой надежностью, высокой чувствительностью, экспрессностью, с возможностью использования данного метода для молочных многокомпонентных продуктов со сложной структурной матрицей, а также продуктов, прошедших глубокую технологическую обработку. Последующая разработка методики измерений позволит осуществлять идентификацию молочной продукции не только по видовому составу применяемого сырья, но и по составу применяемых компонентов, что наиболее важно для обеспечения безопасности молочной продукции.

Раздел 3. Обеспечение безопасности пищевой продукции из ГМИ

Всемирная организация здравоохранения и накопленный опыт науки о нутрициологии определяют питание как один из важнейших факторов, формирующих здоровье человека. Стандартный человеческий организм содержит примерно 60 % воды, 25 % белка, 10 % жира, 4 % минеральных веществ и 1 % углеводов. При этом, это не склад, где все хранится в тишине и покое. Сложнейшая по своей природе биохимическая машина осуществляет многочисленные функции распада и синтеза сотни тысяч органических и неорганических веществ, что в целом обеспечивает необходимый для жизни обмен веществ и его связь с окружающей средой. Известно, что в процессе эволюции человеческий организм потерял способность к собственному воспроизводству многих пищевых веществ, которые получили название незаменимых и должны обязательно поступать с пищей в необходимых количествах и соотношениях. В этой связи стали создаваться модифицированные источники пищи с несвойственными им ранее характеристиками, в том числе пищевые продукты, обогащенные природными или полученными путем химического синтеза нутриентами. В качестве примера другой группы модифицированной пищи можно привести диетические продукты, из состава которых направленно удалены отдельные (элюированы) пищевые вещества, в том числе биологически активные. В последнее время появился принципиально новый способ – генетическое модифицирование, направленное не только на получение новых полезных свойств продукта, но и поиск новых источников жизненно-важных нутриентов. Генетически модифицированные организмы – организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генноинженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинацию генов [13]. Генетически модифицированные источники пищи –

используемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде пищевые продукты (компоненты), полученные из генетически модифицированных организмов [13]. Генная инженерия – совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы. Генная инженерия является «наследницей» традиционно проводимых селекционных работ в области растениеводства и животноводства. В качестве примера можно привести исследования нашего известного соотечественника Ивана Васильевича Мичурина, который путем классических способов скрещивания добивался положительных результатов с очень низкой, а иногда и случайной гарантией получения необходимой комбинации «родительских» генов. При этом с желательными генами не исключена возможность передачи нежелательных, что затрудняет отделение положительных свойств от вредных. Приоритетность генной инженерии заключается в скорости и точности получения желаемых свойств, возможности прослеживания и контроля генетических изменений и их последствий. Рассматривая технологию создания генетически модифицированных организмов представляет целесообразным остановиться на основных терминах и определениях, учитывая сложность и специфичность этих процессов. Векторы - автономные молекулы ДНК, используемые в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиент. Вставка - фрагмент ДНК, который вводится в векторную молекулу. Геном - полный набор генов организма. ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – «энциклопедия жизни», единственный тип молекул, способный к кодированию генетической информации. Клонирование - многократная репликация (размножение) ДНК. Кодон (триплет) - группа из трех смежных нуклеотидов, кодирующая одну из аминокислот. Нуклеотид - молекула, представляющая звено цепи нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). Плазида - внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному

существованию, обычно придающий селективные пре имущества клетке хозяина (например, устойчивость к антибиотикам). Промотор - последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, инициирующая транскрипцию. Рекомбинантная ДНК - молекула ДНК, полученная в результате объединения *in vitro* в природе никогда вместе не существующих фрагментов ДНК (например, ДНК бактерии и растения). Терминатор - последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, вызывающая прекращение транскрипции; Транскрипция - первый этап синтеза белка, когда генетическая информация «переписывается» с ДНК на матричную РНК Трансформация растительных клеток - изменение наследственных свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Целевой ген - отвечающий за проявление заданного признака, например, устойчивости к гербицидам. Экспрессия гена - реализация генетической информации, «работа» гена Создание генетически модифицированных источников пищи – неизбежный путь решения многих проблем питания и здоровья. Современный человек потребляет в сутки ок. 800 г. пищи и 2 л воды, население планеты – более 400 млн т пищи. В международном научном сообществе существует четкое понимание того, что в связи с ростом населения Земли, которое, по прогнозам ученых должно достичь к 2050 г. 11 млрд человек (2009 г. – более 6 млрд), соответственно возникает необходимость значительного увеличения мирового производства сельскохозяйственной продукции, что невозможно без создания генетически модифицированных организмов. Уже сейчас дефицит пищевых продуктов в мире превышает 70 млн т, а число людей, страдающих от недостаточности питания, составляет ок. 1 млрд. Работа по генетическому модифицированию осуществляется по трем основным направлениям: сельскохозяйственные растения, животные и птицы, микроорганизмы. Модификация сельскохозяйственных культур направлена на поиск свойств, обеспечивающих устойчивость к гербицидам, инсектицидам, вирусам, неблагоприятным факторам окружающей среды, повышение выхода продукции, улучшение потребительских свойств, пищевой ценности и др.

Новые технологии получения трансгенных сельскохозяйственных животных и птиц связаны с повышением продуктивности, оптимизацией отдельных частей и тканей туш (тушек), оказывают положительное влияние на качество, физико-химические и технологические свойства мяса. Специфичность и направленность интегрированных генов позволяет изменить структуру и цвет мышечной ткани, pH, жесткость, влагоудерживающую способность степень и характер жирности (жирность), консистенцию, вкусовые и ароматические свойства мяса после технологической обработки. С помощью генной инженерии можно добиться повышения приспособляемости животных и птицы к внешней среде, устойчивости к заболеваниям, направленного изменения наследственных признаков и т.д. Генетическая модификация микроорганизмов служит источником новых продуцентов белка, витаминов, вакцин антибиотиков, ферментов, органических кислот, многих других пищевых веществ и фармакологически активных соединений. Следует отметить, что научные исследования по рассмотренным выше направлениям постоянно развиваются и пополняются новыми научными данными. Не вдаваясь в подробности этих сложных процессов, что является предметом отдельного разговора, представляет целесообразным остановиться на показателях, определяющих качество и безопасность генетически модифицированных источников пищи. Как и в случае традиционных продуктов, потребительские свойства ГМИ оцениваются по органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям. Вместе с тем в отношении этой группы пищевых продуктов существуют специальные системы оценки качества и безопасности, принятые в Европейском Союзе, Соединенных Штатах Америки и России, поскольку такое «быстрое» вмешательство человека в эволюционные процессы живой природы неизменно вызывает опасения возможных нежелательных эффектов. Особое отношение к этой проблеме имеют случаи, когда используется неинтравидовые «донорские гены», например, у растений – животные, и наоборот. В основу методологии систем оценки качества и безопасности

положена Концепция композиционной эквивалентности. Она определяется сравнением трансгенного продукта с его традиционным аналогом и включает весь необходимый набор исследований. Если трансген не отличается от аналога по молекулярным и фенотипическим характеристикам, уровням содержания ключевых нутриентов, антиалиментарных, токсичных веществ и аллергенов, то данный ГМИ относят к первому классу безопасности и дальнейшие исследования не проводят. При обнаружении некоторых различий с традиционным аналогом, заключающихся в присутствии новых или при отсутствии каких-либо компонентов, - ко второму классу. В этом случае исследования сосредоточены именно на этих различиях. При полном несоответствии аналогу - к третьему классу, при котором экспериментальная оценка ГМИ продолжается по установленной схеме. В настоящее время большинство ГМИ пищи относят ко второму классу безопасности, учитывая присутствие в их составе 1-2 белков, отвечающих за проявление желаемого признака, что отличает трансгенный продукт от традиционного. Концепция композиционной эквивалентности в ближайшем будущем может оказаться несостоятельной в связи с началом массового производства трансгенных продуктов с измененным составом. В качестве путей решения этой проблемы предлагается использовать такие направления науки, как геномика - определение структуры и функции ДНК; протеомика - определение белкового профиля; метаболомика - определение вторичных метаболитов. По принятой в Европейском Союзе системе (рис.2), одобренной ВОЗ и ФАО, если в ходе изучения химического состава трансгена не обнаруживается каких-либо отличий от его традиционного аналога (по молекулярным и фенотипическим характеристикам, уровням содержания ключевых нутриентов, антиалиментарных, токсичных веществ и аллергенов, характерных для данного вида продукта или определяемых свойствами переносимых генов), данный генетически модифицированный источник пищи причисляют к первому классу безопасности, не нуждающемуся в дальнейших исследованиях. Если обнаруживаются некоторые различия с традиционным

аналогом (присутствие новых и/или отсутствие каких-либо компонентов) - ко второму классу, и исследования сосредоточены именно на этих различиях, а если имеет место полное несоответствие аналогу - к третьему классу безопасности, при этом экспертная оценка генетически модифицированного источника пищи должна быть продолжена. В США набор обязательных исследований ГМИ пищи включает три основных этапа, из которых первый и второй - изучение композиционной эквивалентности и свойств нового белка аналогичны принятым в Европейском Союзе, тогда как третий этап (исследование на животных) проводится на крысах, цыплятах-бройлерах, рыбах и дойных коровах, что обусловлено необходимостью сравнения пищевой ценности изучаемого продукта с его традиционным аналогом. В России, вся пищевая продукция, полученная из ГМИ, проходит обязательную регистрацию и санитарно-эпидемиологическую экспертизу согласно требованиям нормативных документов, экспертиза осуществляется по трем направлениям: медико-генетическая оценка; медикобиологическая оценка; оценка технологических параметров. Медико-биологическая оценка ГМИ пищи включает следующие направления. Композиционная эквивалентность – белок (аминокислотный состав), жир (жирнокислотный состав), углеводный состав, минеральный состав, содержание витаминов, специфические компоненты, биологически активные вещества, контаминанты (природные, антропогенные); Хроническая токсичность ГМИ пищи – интегральные показатели, биохимические показатели, гематологические показатели, морфологические исследования, чувствительные биомаркеры: активность ферментов I и II фазы биотрансформации ксенобиотиков, активность ферментов системы антиоксидантной защиты, содержание продуктов перекисного окисления липидов. Специальные исследования – аллергенные свойства, влияние на иммунный статус, влияние на репродуктивную функцию, нейротоксичность, генотоксичность, мутагенность, канцерогенность. В России, как и в большинстве стран мирового сообщества, для идентификации ГМИ используются метод полимеразной цепной реакции (ПЦР),

позволяющий определить ГМИ в пищевом продукте, даже если его содержание не превышает 0,9%. Такой подход соответствует современным рекомендациям Всемирной организации здравоохранения. В 2003 году этот метод утвержден и введен в действие национальными стандартами Российской Федерации. В целом, комплексная оценка пищевой продукции, полученной из ГМИ, состоит из следующих основных направлений (рис. 6). Развитие биотехнологии в области генетически модифицированных источников ставит людей перед лицом не только медицинских, но и моральноэтических проблем, которые вызывают широкий резонанс в общественном мнении и средствах массовой информации. К решению этих вопросов привлечено внимание ученых социологов, религиозных деятелей и философов.

В настоящее время сформулировано 12 основных этических принципов практического применения биотехнологии или так называемых принципов биотехнологической промышленной организации (Biotechnology industry Organization): -использование достижений биотехнологии только во благо человека - спасение жизни и медицинские цели, недопущение применения достижений биотехнологии, нарушающих права человека, или если риск превышает преимущества; -внимательное отношение к мнению тех, кто выражает озабоченность по поводу применения биотехнологии - уважение разных мнений, культурных, религиозных и социальных традиций; всяческое содействие распространению правдивой информации о биотехнологии - образовательные программы в области биотехнологии; главный приоритет – здоровье человека, безопасность биотехнологических продуктов и защита окружающей среды - Работа только в рамках законодательно действующей базы; право сохранения конфиденциальности при использовании медицинской информации, в том числе результатов генетического тестирования - недопущение дискриминации в любой форме; уважительное «человеческое» отношение к животным, вовлеченным в лабораторные

исследования; условия проведения генетического тестирования и генетического исследования людей - только для лечебных целей, запрет на клонирование человека, запрет на генетические модификации эмбриональных клеток даже с лечебной целью; информирование пациентов, участвующих в клинических исследованиях - строгое соблюдение всех норм и законодательных актов, обязательное согласие исследуемого; создание ГМ растений исключительно с целью увеличения производства продуктов питания, улучшения их качества, обеспечения развития устойчивого сельского хозяйства и охраны окружающей среды; создание биотехнологических продуктов с целью более эффективного уничтожения отходов; запрещение использования достижений биотехнологии для создания оружия массового уничтожения - биологическая конвенция по вооружениям, запрещающая разработку и использование биологического оружия; сохранение биологического разнообразия - сбережение генетического материала. В настоящее время сформулировано такое понятие, как «биоэтика». Это совокупность понятий и принципов, направленных на моральное совершенствование человечества, охрану прав и достоинств человека в связи с революционными достижениями современной биотехнологии, особенно молекулярной генетики, генетической инженерии, расшифровки генома человека и животных. В сферу интересов биоэтики включаются также проблемы создания и интродукции в биосферу трансгенных растений, животных и микроорганизмов, а также использование генетически модифицированных пищевых продуктов. В мире уже создано и разрешено для реализации значительное количество генетически модифицированных организмов. Производимые с их использованием пищевые продукты широко представлены на мировом продовольственном рынке, и эта положительная тенденция продолжает увеличиваться, основываясь на фундаментальных и прикладных научных исследованиях в области гигиены питания и биотехнологии. В России и странах Европейского Союза введена обязательная маркировка пищевой продукции, содержащей более 0,9 % компонентов из

ГМИ, включая произведенную из ГМИ, но не содержащую ДНК и белка. В заключении следует остановиться еще на одном научном суждении – «технологический императив», - согласно которому все, что технически возможно, должно непременно реализоваться. В отношении генетически модифицированных источников «технологический императив» не является безусловным и человеческий разум, основываясь на объективных научных результатах, должен совладать с необходимыми предостережениями до выхода новых технологий на уровень практического применения.

Раздел 4. Молекулярно-генетический мониторинг производственных процессов

В настоящее время для обнаружения и идентификации микроорганизмов разработан ряд технологий и коммерческих приложений, позволяющих выявлять нуклеиновые кислоты, входящие в состав микроорганизмов. Различные методы обнаружения и идентификации микроорганизмов активно разрабатываются в течение многих лет. Одним из наиболее перспективных направлений в молекулярно-генетической идентификации микробиоты в пищевых субстратах считаются технологии, основанные на анализе ДНК. Данный обзор посвящен рассмотрению различных аспектов идентификации микроорганизмов в пищевых субстратах на основе современной научной и методической литературы, а также запатентованных решений. Значительное внимание также уделено классическим методам идентификации микроорганизмов. Приводятся различные аспекты применения ПЦР для анализа микробных сообществ. Показано развитие современных технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) ДНК микробных сообществ в пищевых субстратах. Особое внимание уделено современным стратегиям идентификации патогенов с использованием NGS.

В настоящее время для обнаружения и идентификации микроорганизмов разработан ряд технологий и коммерческих приложений, позволяющих выявлять нуклеиновые кислоты, входящие в состав микроорганизмов. Различные методы обнаружения и идентификации микроорганизмов активно разрабатываются в течение многих лет. Эти методы можно разделить на три группы: – классические методы идентификации микроорганизмов; – методы ПЦР; – высокопроизводительное секвенирование. Среди методов идентификации биологических образцов микроорганизмов наибольшее распространение получили методы, основанные на анализе структуры ДНК. Прогресс в освоении методов ДНК-диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе ПЦР. В методе ПЦР маркером жизнеспособности бактерий служит недолго живущий ген – специфичная мРНК, с помощью которой можно выделить патогенные бактерии. Молекулярно-генетические методы метагеномного анализа состава бактериального сообщества позволяют выявлять микроорганизмы в пищевых продуктах без предварительного культивирования и без выделения видоспецифических фрагментов по суммарной ДНК и амплификации генов, кодирующих рРНК. Секвенирование следующего поколения (NGS) в совокупности описывает несколько технологий, которые обеспечивают массовое параллельное секвенирование гетерогенных фрагментов ДНК. Данный метод применим к мониторингу микробного сообщества, который заключается в амплифицировании коротких фрагментов ДНК с использованием универсальных PCR-праймеров, нацеленных на известные маркерные гены, преимущественно прокариотические 16S rRNA и грибковые ITS гены. Цель исследования – рассмотрение различных аспектов идентификации микроорганизмов в пищевых субстратах на основе современной научной и методической литературы, а также запатентованных решений. Результаты и их обсуждение

1. Классические методы идентификации микроорганизмов. Традиционный

методом микробиологического мониторинга сообщества микроорганизмов включает в себя выделение и культивирование микробиоты. В рамках данного направления осуществляются следующие методики: стандартный подсчёт колоний (КОЕ), микроскопический подсчёт колоний, посев на скошенный агар. Известен способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей путем посева анализируемых проб на селективные питательные среды в чашки Петри, термостатирования в течение 24–72 часов при температуре $25-37 \pm 1$ °С. О принадлежности микроорганизмов к данной группе судят по характеру роста на конкретной среде и по виду колоний. Способ весьма трудоемок и продолжителен во времени. Известен быстрый (15–30 мин) способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей, основанный на методах окраски с последующим микроскопированием. Способ включает следующие операции: приготовление фиксированного мазка исследуемого образца, окрашивание препарата, промывание водопроводной водой, подсушивание и микроскопирование с иммерсионной системой. О принадлежности микроорганизмов к бактериям, грибам или дрожжам судят по морфологическим особенностям окрашенного препарата. Известен способ обнаружения микробов в молоке с помощью посева пробы в питательные среды. Способ предусматривает смешивание исследуемых проб в различных разведениях с питательной средой, в качестве которой применяют питательный агар с 1 % глюкозы на основе из смеси панкреотического перевара молока, мяса или казеина и дрожжевого аутолизата (в отношении 3:1), культивирование смеси при 30–32 °С в течение 3 суток с последующим учетом образовавшихся колоний. Способ оказался неэффективным при обнаружении возбудителя сибирской язвы, когда он находится в пробе в малых концентрациях. После разработки и применения новых микроскопических и микробиологических методов исследования было показано, что большинство микроорганизмов существует в окружающей среде в виде микробиологических сообществ (биопленок), образуемых на биотических и абиотических поверхностях. В составе этих сообществ

обнаружены и некультивируемые формы членов сообщества. То, что бактериологическими методами не удастся выделить индикаторные или патогенные бактерии в сырье и продуктах животного происхождения может объясняться переходом их в покоящееся состояние. Выделение таких покоящихся форм без культивирования на питательных средах возможно различными методами, например, прямого подсчета жизнеспособных клеток в комбинации с добавлением специфических моноклональных антител (МА); методами люминометрии для тестирования естественно люминесцентных бактерий (*Pseudomonas fluorescens* и др.) и бактерий, получивших гены, кодирующие комплекс ферментов люцеферин-люцеферазы, генноинженерным способом; методами жидкостной флюориметрии, позволяющими определять общее число микробных клеток, в том числе погибших, живых и некультивируемых, но жизнеспособных клеток (такой метод требует оборудование, реактивов-красителей и специальных компьютерных программ). Химические методы. Метод основан на качественном и количественном определении выделяемых метаболитами микроорганизмов в питательную среду, которые подвергаются специфическим химическим реакциям. К химическим методам в микробиологии относят определение термостабильной нуклеазы, измерение количества АТФ, радиометрию, флуорогенные и хромогенные субстраты. Присутствие *Salmonella aureus* в продуктах можно выявить, подвергнув продукт анализу на предмет присутствия термостабильной нуклеазы. Радиометрия. Метод основан на включении в бактериальный метаболизм органики, содержащей радиоактивный углерод-14. Впервые радиометрия была применена для определения бактерий Levin и используется в клинической микробиологии, однако, в некоторых случаях она применима и для контроля качества продуктов и питьевой воды [26]. Previte использовал этот метод для определения присутствия *Salmonella aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium botulinum* и спор гнилостного анаэроба 3679 на говядине. Серотипирование является наиболее распространённым методом

для определения присутствия грамотрицательных бактерий, таких как *Salmonella* и *Escherichia*. Из грамположительных бактерий этим методом лучше всего определяются бактерии рода *Listeria*. Серологическая классификация сальмонелл была начата Kauffmann в начале 1940-х гг. [19]. Обогачительный серологический метод. 1–2 тест на сальмонелл схож с обогачительным серологическим методом, основанном на взаимодействии антител со штаммами сальмонелл, имеющими жгутики [19]. Радиоиммунологический анализ. Метод заключается в радиоактивном мечении антигенов, которые затем взаимодействуют с антителами. В широком смысле иммунохроматографическая аналитическая система обозначает продольное или поперечное стекание культуральной жидкости по пластине-носителю, содержащей антитела, с прохождением иммунохимической реакции. Разработка иммунографических систем для обеспечения безопасности пищевой продукции и повышения контроля качества открывает новые направления исследований. Активно разрабатываются и методы Люхлюминесценции для определения микроорганизмов, контаминирующих сырье и продукты животного происхождения. Широко применяются физические методы контроля: измерение сопротивления, биосенсоры, микрокалориметрия, проточная цитометрия. Метод жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии. Жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрия представляют собой метод аналитической химии, который объединяет физические возможности разделения жидкостной хроматографии с возможностями масс-анализа масс-спектрометрии. В то время как жидкая хроматография разделяет смеси с несколькими компонентами, масс-спектрометрия обеспечивает структурную идентичность отдельных компонентов с высокой молекулярной специфичностью и чувствительностью обнаружения. Этот tandemный метод может быть использован для анализа биохимических, органических и неорганических соединений, обычно встречающихся в сложных образцах экологического и биологического происхождения. Поэтому LC-MS может применяться в

широком спектре секторов, включая биотехнологию, мониторинг окружающей среды, пищевую промышленность, фармацевтическую, агрохимическую и косметическую промышленность. Так, шведские ученые при помощи LC-MS провели количественный анализ церегулированного токсина *Bacillus cereus* в рисе и макаронах. LC-MS также используется для анализа натуральных продуктов и профилирования вторичных метаболитов в растениях. PAGE – метод фракционирования смесей белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Разделение белков, которое необходимо для идентификации токсинов в пищевых продуктах, проводят с помощью жидкостной хроматографии, но также используются методы на основе геля. Анализ бактериальной секреции белков позволяет выявить роль секретируемых, мембранных и клеточных белков в патогенности. В одном из таких исследований для анализа секретов резистентного к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* использовали натрий-додецилсульфатный полиакриламидный гель-электрофорез (SDS PAGE) и сильное катионообменное фракционирование, объединенное с tandemной масс-спектрометрией. Было идентифицировано в общей сложности 174 различных энтеротоксинов. Для оценки патогенности и токсигенности выделенных штаммов микроорганизмов разработаны методы биотестирования на лабораторных животных и на клеточных культуральных системах. Для своевременной оценки безопасности сырья и продукции принципиальное значение имеет время получения результатов. Так, проточный цитофлуориметр BD FACSMicroCount позволяет проверить сырье, промежуточный и конечный продукт в течение 24 ч. Метод позволяет проводить количественный учет как микроорганизмов – контаминантов, так и необходимых для технологического процесса микроорганизмов. Например, подсчет пробиотических молочнокислых бактерий. Флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот проникает в мембрану и связывается с нуклеиновыми кислотами, а дополнительный реагент связывается со

свободным флуоресцентным красителем в растворе не попавшим в погибшие клетки и останавливает флуоресценцию. Сфокусированный лазерный луч с длиной волны 639 нм сталкивается с меченым микроорганизмом, а датчики светорассеяния и флуоресценции в оптической системе формируют графическое отображение результатов анализа. Все вышеперечисленные методы часто трудоемки и длительны, а идентификация за пределами родового уровня часто затруднена. К примеру, они позволяют выявить сальмонеллы и листерии в продуктах питания в течение четырех-пяти дней, биохимическая и серологическая идентификации дополнительно занимают два-три дня. Таким образом, определить насколько опасен продукт можно уже после того, как он поступит в продажу и к потребителям.

2. Использование метода ПЦР для анализа микробных сообществ. Среди методов идентификации биологических образцов микроорганизмов наибольшее распространение получили методы, основанные на анализе структуры ДНК. Прогресс в освоении методов ДНК-диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе ПЦР. В методе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) маркером жизнеспособности бактерий служит недолго живущий ген – специфичная мРНК, с помощью которой можно выделить патогенные бактерии, в том числе сальмонеллы и листерии и санитарно-показательные микроорганизмы, например, *Enterococcus faecalis* и др. Молекулярно-генетические методы метагеномного анализа состава бактериального сообщества позволяют выявлять микроорганизмы в пищевых продуктах без предварительного культивирования и без выделения видоспецифических фрагментов по суммарной ДНК и амплификации генов, кодирующих рРНК. Для большинства бактерий уже существуют банки данных для последовательностей рРНК и генов, их кодирующих. В настоящее время методы с использованием ПЦР и праймеров на основе прямого секвенирования частиц или почти полных 16S и 23S ДНК широко используются для идентификации как некультивируемых

форм известных бактерий, так и неизвестных микроорганизмов, которые не могут расти на обычных питательных средах и в используемых условиях культивирования. Основные молекулярно-биологические методы, используемые для дифференциации и идентификации организмов, можно разделить на три категории: методы, базируемые на рестрикции, на амплификации (ПЦР) и на совокупности последних. К первой группе относится техника RFLP, которая заключается в фрагментировании нативной ДНК исследуемого организма с помощью ферментов рестриктаз и последующим разделении полученных фрагментов при помощи Пульс-Гель Электрофореза (PFGE) [4]. Обладая оригинальным принципом разделения фрагментов ДНК в геле, тем не менее данный метод весьма трудоемок на стадии получения и рестрикции целой нефрагментированной ДНК. Ко второй группе относятся такие техники, как: AP-ПЦР – случайная ПЦР, осуществляемая без знания нуклеотидной последовательности организма, основанная на геномном распределении случайных повторов; гер-ПЦР – техника представляет собой комплекс праймеров на часто повторяющиеся в геномах энтеробактерий последовательности, получившие названия; микросателлитная ПЦР – техника, основанная на геномном распределении микросателлитных последовательностей типа (GC)₄, (GTG)₅; тРНК-ПЦР – техника, основанная на геномном распределении консервативных участков генов тРНК; IS-ПЦР – техника, основанная на геномном распределении последовательностей мобильных элементов, встречаемых в геноме исследуемого организма *gyrB*; ПЦР анализ с праймерами на целевые гены (такими генами могут быть гены домашнего хозяйства (*housekeeping*), рибосомальный кластер (16S рРНК, межгенная область, расположенная между генами 16S рРНК и 23S рРНК, 23S рРНК) [17], а также симбиотические гены (*sym*-гены, *nod*-гены), гены патогенности (*hrp*) и др.), секвенирование ДНК. К третьей группе методов относятся: AFLP и его различные модификации. *saAFLP* – техника, основанная на сопоставлении длин амплифицированных фрагментов, получаемых путем первоначального фрагментирования общей

ДНК организма ферментами рестриктазами, затем легирования полученных рестрикционных фрагментов с короткими (10–30 п. о.) двухцепочечными нуклеотидными последовательностями (адаптерами) и последующей ПЦР с праймерами, нуклеотидные последовательности которых комплиментарны последовательностям адаптеров. ПЦР-RFLP – техника, основанная на сопоставлении длин рестрикционных фрагментов целевых генов, накопленных предварительно в большой концентрации путем ПЦР. У каждого из этих методов есть свои преимущества и недостатки, однако, их совокупное использование позволяет обеспечить высокую достоверность идентификации и последующей дифференциации таксономических порядков разного уровня. Известна методика, основанная на амплификации, секвенировании и/или рестрикции межгенного региона рибосомального кластера 16S рРНК и 23S рРНК, позволяющая одновременно определять, идентифицировать и дифференцировать различные таксоны прокариот. Известны методические указания, устанавливающие метод ускоренного выявления (посредством ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией) в пищевых продуктах патогенных бактерий – возбудителей острых и хронических инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи (родов *Salmonella*, *Shigella* (в комплексе с энтероинвазивными *E. coli*), вида *Enterobacter* (*Cronobacter*) *sakazakii*, энтерогеморрагических веротоксигенных *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter* spp. видов *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, а также *Listeria monocytogenes*). Представленный в настоящих указаниях метод является альтернативным классическому бактериологическому посеву и предусматривает ускоренное определение наличия или отсутствия ДНК и, соответственно, бактерий в определенной массе (объеме) пищевого продукта, подвергнутого инкубации в жидких селективных питательных средах (при необходимости дополнительно прединкубации в неселективных средах). Принципом метода является выявление путем ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией последовательностей (фрагментов) ДНК, строго специфических для геномов бактерий. В основе ПЦР лежит многократное

увеличение числа копий (амплификация) нуклеотидных фрагментов – мишеней ДНК, ферментом Taq-полимеразой в присутствии синтетических олигонуклеотидных праймеров и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Так, например, гибридизация флуоресцентномеченых олигонуклеотидных зондов, присутствующих в составе реакционной смеси, с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени сопровождается нарастанием флуоресценции. Измерение интенсивности флуоресцентного сигнала позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации. Все диагностические системы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, значительно чувствительнее других методик. Так, метод ПЦР позволяет обнаружить в образце одиночные молекулы нуклеиновых кислот микроорганизма за достаточно короткое время. Не менее важной характеристикой диагностических методов является специфичность, поскольку необходимо свести к минимуму фоновые сигналы и устранить ложноположительные результаты в образцах, которые зачастую представляют собой сложную смесь органических и неорганических соединений. При этом «неспецифика» может также возникать в случае наличия в пробах высоких концентраций конкурирующих антигенов или фрагментов ДНК. В случае с методами, основанными на ПЦР, высокая чувствительность может быть их слабым местом вследствие возможной контаминации образца и получения ложноположительного результата из-за ингибирования работы полимеразы различными веществами, включая гуминовые кислоты и гем. Другим важным требованием к диагностическим методам является их воспроизводимость. На этот параметр может влиять целый ряд факторов, таких как стабильность реагентов и различия в условиях анализа. Таким образом, использование ПЦР имеют целый ряд очевидных преимуществ перед традиционными методами исследования идентификационных генетических маркеров: – более высокая информативность; – возможность проводить в едином комплексе исследование значительного числа генетических маркеров, в том числе различных по их экспертной функции (например, маркеров полиморфных

локусов), что методически удобно и обеспечивает экономное расходование экспертного материала и максимальную сопоставимость результатов исследования; – применение праймеров, специфичных для ДНК микроорганизмов, позволяет избежать актуальной для иммунологических методов проблемы ложноположительных результатов вследствие загрязнения; – вещества, содержащиеся в предмете-носителе, в ряде случаев могут приводить к отрицательному результату типирования за счет ингибирования ПЦР. Однако в иммунологических методах влияние предмета-носителя может создавать риск получения ложноположительного результата, что более опасно; – результаты ДНК-анализа наглядны; легко документируются, что позволяет сохранить и предоставить первичные материалы. Это обеспечивает высокую достоверность данных, а, следовательно, повышает ценность экспертного заключения; – метод ПЦР хорошо поддается автоматизации, тем самым обеспечивается высокая пропускная способность метода, стандартность выполнения процедуры, сведение к минимуму риска ошибок за счет субъективного фактора.

3. Развитие современных технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК микробных сообществ. Секвенирование следующего поколения (NGS) в совокупности описывает несколько технологий, которые обеспечивают массовое параллельное секвенирование гетерогенных фрагментов ДНК. Данный метод применим к мониторингу микробного сообщества, который заключается в амплифицировании коротких фрагментов ДНК с использованием универсальных PCR-праймеров, нацеленных на известные маркерные гены, преимущественно прокариотические 16S rRNA и грибковые ITS гены. На данный момент только две системы NGS используются для профилирования микробных сообществ: это секвенирующие платформы 454 Life Sciences пиросеквенирование и Illumina. NGS обеспечивает представление о составе микробных популяций и показывает, что улучшение и применение таких методов в пищевой микробиологии может быть отличным способом для детального анализа микробиологического качества пищи.

Идентификация критических этапов производственного процесса может иметь большое значение для контроля микробной нагрузки и предлагать решения для безопасного производства продуктов питания [30]. Общий принцип методов секвенирования нового поколения, основанных на предварительной амплификации матриц, приблизительно одинаков независимо от реагентно-аппаратной базы. Он включает: стадию получения библиотек, заключающуюся в получении небольших фрагментов ДНК и введении в их состав адаптерных нуклеотидных последовательностей для закрепления на носителе и отжига специфических праймеров для секвенирования; стадию иммобилизации полученных фрагментных библиотек на микросферах или поверхности проточной ячейки с последующей амплификацией с помощью эмульсионной или мостиковой PCR соответственно; стадию гибридизации специфических праймеров с адаптерными участками и непосредственно секвенирования. При этом подходе прочтение последовательности всегда связано с достройкой комплементарной цепи. Причем достройка может осуществляться либо путем синтеза новой цепи, либо путем легирования. Достройка цепи сопровождается испусканием сигнала, природа которого зависит от типа платформы для секвенирования. Сигнал регистрируется прибором, который переводит его в последовательность нуклеотидов. Преимущества NGS в отношении методов профилирования первого поколения, таких как DGGE и TRFLP, многочисленны. Все системы секвенирования следующего поколения за один прогон читают сразу несколько участков генома. Таким образом, NGS позволяет сравнивать сообщества по филогенетическому сходству [32]. NGS – это постоянно развивающаяся технология и наряду с ее многочисленными преимуществами возникают новые проблемы для анализа. Основными проблемами являются: вычислительный анализ, мощность и хранение полученных данных. Множественные результаты, полученные на платформах NGS, затрачивают гигабайты памяти на жестком диске и значительные вычислительные мощности для обработки этих файлов. Требования к этим

параметрам растут параллельно с увеличением охвата чтения [30]. Все модификации NGS можно поделить на две большие группы: первый тип методов основан на секвенировании заранее амплифицированных фрагментов ДНК из пробы, второй тип связан с прочтением первичной последовательности единичных молекул. Некоторые из них достаточно экзотичны. Например, чтение нуклеотидных остатков ДНК электронным или оптическим способом по мере того, как молекула «протискивается» через нанопору. Длинный перечень улучшений системы капиллярного электрофореза в сочетании с возрастающей автоматизацией и усовершенствованием программного обеспечения позволили снизить стоимость секвенирования в 13 раз с тех пор, как первые автоматические секвенаторы появились в прошлом десятилетии. Пиросеквенирование или 454-секвенирование, появившееся первым из всех методов NGS, использует для детекции светового сигнала, возникающего при достройке комплементарной цепи ДНК [32–34], в то время как полупроводниковое секвенирование основано на фиксации изменения рН, происходящего вследствие отщепления протона при образовании фосфодиэфирных связей при достройке цепи [35–38]. Третий вариант — это секвенирование путем лигирования, при котором детектируется флуоресцентный сигнал, возникающий в процессе достройки комплементарной цепи в ячейке. Через неё пропускают смесь, содержащую лигазу и специальные флуоресцентно меченные нуклеотидные зонды (октамеры) [39]. Наиболее распространенным вариантом является секвенирование путем синтеза с использованием обратимо терминированных флуоресцентных нуклеозидтрифосфатов. Амплификация проводится внутри проточной пористой ячейки, через которую пропускаются реагенты для синтеза ДНК [40]. В результате амплификации с использованием мостиковой ПЦР внутри каналов ячейки генерируются кластеры копий исходных фрагментов библиотеки, каждый из которых соответствует одному прочтению. Высокая плотность кластеров (до 800–900 тыс. на мм²) обеспечивает максимально большой объем получаемых

данных. Затем полученные кластеры молекул ДНК секвенируются по принципу, сходному с секвенированием по методу Сэнгера [41, 42]. К недостаткам методов высокопроизводительного секвенирования, основанных на предварительной амплификации ДНК-фрагментов, можно отнести: 1. ошибки в гомополимерных участках и местах, где имеются одонуклеотидные полиморфизмы; сложности разрешения в повторах; 2. зависимость точности прочтения от GC-состава фрагментов ДНК и т. д [43–45]. Поэтому в настоящее время разрабатывают альтернативные методы секвенирования, в частности мономолекулярное секвенирование. Одна из технологий мономолекулярного секвенирования основана на пропускании секвенируемого участка ДНК через активный центр ДНК-полимеразы. Высокочувствительной CCD-камерой фиксируется сигнал от присоединения флуоресцентно меченого нуклеотида, попадающего в активный центр ДНК-полимеразы в процессе достройки комплементарной цепи. При присоединении нуклеотида флуоресцентная метка отщепляется и сигнал падает до фонового уровня. Затем в активный центр попадает следующий нуклеотид, и цикл повторяется [46]. Используемая в этой технологии ДНК-полимераза Деревщикова М. И. [и др.] Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48. № 4 С. 87–113 93 фага ф29 высокопроцессивна, скорость ее работы составляет около 10 нуклеотидов в секунду. Эта технология позволяет прочитывать длинные молекулы ДНК (до 10–20 тыс. п. о.) и имеет целый ряд практических приложений [47–53]. Другим вариантом мономолекулярного секвенирования является секвенирование с использованием мембран с нанопорами: если мембрану, содержащую такие поры, поместить в электрофоретическую ячейку, то одноцепочечные молекулы ДНК могут протягиваться через пору. При этом происходит изменение силы тока, проходящего через мембрану [54]. При таком протягивании в зависимости от типа нуклеотида происходит определенное по амплитуде и продолжительности изменение силы тока, что дает возможность определить, какой именно нуклеотид находится в полости поры именно сейчас. В настоящее время существует только одна коммерческая серия

компактных приборов, в которых реализована данная стратегия секвенирования (MinION компании Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Они распространяются в рамках программы раннего доступа [55]. К безусловным преимуществам нанопорового секвенирования относится возможность делать длинные прочтения без покупки дорогостоящего оборудования. В качестве недостатков отмечают высокую частоту ошибок: 12–20 % [62]. Однако в настоящий момент все больше исследователей признают перспективность нанопорового секвенирования для метагеномных исследований, секвенирования небольших геномов, идентификации вирусных и бактериальных инфекционных агентов. Современные методы секвенирования ДНК также можно условно разделить на три основных вида: классические – секвенирование с помощью капиллярного электрофореза и пиросеквенирование; новые («второго» поколения – Next Generation Sequencing – NGS) – проводят одновременно секвенирование миллионов фрагментов ДНК, каждый из которых представлен кластером из многих тысяч или сотен тысяч своих клонов – это высокопроизводительное пиросеквенирование, циклическое лигазное и полупроводниковое секвенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых предшественников; новейшие («третьего» поколения – Next-Next Generation Sequencing – NNGS) методы секвенирования, которые считывают информацию с миллионов единичных фрагментов ДНК без их предварительного клонирования [57].

3.1. Современные стратегии идентификации патогенов с использованием NGS. Основными группами патогенов, представляющих наибольшую опасность для человека, являются бактерии и вирусы. Другие патогены, такие как грибы или протисты, не менее опасны, однако, обычно не требуют генетического анализа для идентификации. На сегодняшний день основным приемом, позволяющим охарактеризовать разнообразие микроорганизмов в пробе, является метагеномный анализ. Подобный анализ стал возможным (и даже рутинным) благодаря разработке методов высокопроизводительного секвенирования.

Биоразнообразие пробы характеризуют с помощью двух стратегий: таргетного секвенирования выбранных маркерных участков и полноценного тотального секвенирования метагенома. Первый способ существенно проще технически, требует меньших временных и финансовых затрат на подготовку образцов, секвенирование и обработку данных. Однако он имеет существенное ограничение: позволяет провести только оценку разнообразия, тогда как второй способ позволяет получить исчерпывающую информацию о составе и генетических свойствах конкретного сообщества. Обычно в качестве маркерных участков в метагеномных образцах используют участки генов 16S или 18S рРНК у прокариот и эукариот или ITS-участки грибов [79–81]. В зависимости от задачи маркерные участки могут быть и иными. К примеру, для характеристики резистоста в метагеномном образце используют участки генов устойчивости к антибиотикам. Второй способ требует существенно больших временных и финансовых затрат, но при тотальном секвенировании метагеномов получают полногеномные данные, представляющие собой различные фрагменты ДНК организмов, содержащихся в анализируемом метагеномном образце, на основе которых впоследствии собирают референсный геном. Анализируют подобные данные тремя различными способами. Первый способ предусматривает сравнение определенных маркерных последовательностей генов с известными последовательностями базы данных для подобных генов определенных организмов [82–84]. Второй способ основан на кластеризации всех чтений образца по таксономическим группам, например, на основе их сходства с известными полногеномными последовательностями [85–88]. Наконец, третий способ связан со сборкой полученных контигов в целые гены или даже геномы *de novo* [88, 90]. В случае с идентификацией новых патогенов группа методов анализа данных тотального секвенирования метагенома может быть наиболее важной, поскольку позволяет не только оценить биоразнообразие образца, но и идентифицировать в его составе отдельные гены. Таким образом, оба подхода имеют свои достоинства и ограничения: секвенирование маркерных участков

позволяет быстро и с небольшими материальными затратами установить разнообразие генетического материала в образце, тогда как результаты тотального секвенирования метагенома позволяют получить исчерпывающую информацию о патогенных детерминантах (метатоксиком, метарезистом и пр.). Большая часть этой информации не будет представлять ценности, но позволит не упустить генетические элементы, обуславливающие эпидемическое значение патогенов в составе образца. Целесообразно заменять полногеномный анализ сложным реагентным комплексом, состоящим из нескольких сотен олигонуклеотидных последовательностей, комплементарных наиболее важным и эпидемически значимым патогенным детерминантам, что позволит ускорить и удешевить процедуру метагеномной характеристики образца. Использование тотального/ полногеномного секвенирования может быть оправдано в отдельных сложных случаях уже после первичной детекции для подробной характеристики генетических особенностей смешанного образца или уже изолированного патогена. Существующие методы NGS идеально подходят для анализа, идентификации и расшифровки генома выделенных в чистую культуру прокариотических организмов и открывают новые возможности в области идентификации неизвестных патогенов в смеси микроорганизмов. Определенную сложность при метагеномной характеристике образцов на предмет содержания в них прокариотических организмов представляют выявление фактов горизонтального переноса генов от одного члена метагенома к другому и корректное распределение информации по отдельным представителям микробного сообщества. Решением этих проблем для хромосомных генетических элементов является повышение степени покрытия отдельными рядами хромосомных последовательностей отдельных компонентов метагенома. Фактором, определяющим качество получаемой в результате секвенирования информации, является пробоподготовка образца. Ее влияние прослеживают, анализируя особенности идентификации вирусов.

Использование секвенирования по Сэнгеру позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар нуклеотидов и применяется для небольших фрагментов генома/генов. Оно используется для: 1. секвенирования отдельных участков генома с целью анализа мутаций и полиморфизмов; 2. идентификации вирусов и организмов (бактерий, растений, грибов и животных); 3. валидации данных, полученных на платформах NGS; 4. микросателлитного анализа; 5. анализа делеций и инсерций (малых и протяженных). Наиболее популярными секвенаторами, использующими технологию секвенирования по Сэнгеру, являются приборы, производимые компанией Thermo Fisher Scientific: 3730xL, 3730, 3500xL, 3500, 3130xL, 3130, 310. Следует отметить, что все описанные выше типы исследований сейчас можно проводить с помощью NGS, однако, главные плюсы секвенирования по Сэнгеру – высокая точность (достоверность) полученных данных и невысокая стоимость работ при анализе небольшого количества ДНК-фрагментов – сохраняют актуальность этого типа определения последовательности нуклеиновых кислот. За последние полтора десятилетия были разработаны, коммерциализированы и продолжают успешно развиваться совершенно новые технологии определения последовательности нуклеиновых кислот, в основе которых лежит стремление к миниатюризации, автоматизации, увеличению объема получаемых данных, а также удешевлению процесса. Появление NGS впервые позволило значительно ускорить и удешевить определение полной последовательности миллионов геномов организмов, начиная от бактерий и заканчивая человеком. Более того, появилась реальная возможность одновременно оценивать экспрессию (работу) тысяч генов в организмах, тканях и единичных клетках (секвенирование транскриптомов), а также анализировать регуляцию их активности (анализ экспрессии микроРНК и метилирования генома). В настоящее время на рынке представлено сразу несколько разработок, позволяющих определять последовательность полных геномов организмов, проводить анализ экспрессии генов и метилирования генома. Эти подходы реализуются на секвенаторах нового поколения

производства коммерческих компаний Illumina, Thermo Fisher Scientific, Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies. Часть разработанных платформ уже ушли с рынка (например, GS FLX, 454/Roche или HeliScope/Helicos Bioscience). Другие, пройдя несколько реинкарнаций и модификаций, прочно закрепились на нем (Illumina и Thermo Fisher Scientific). Третьи только нащупывают почву, намереваясь занять свою нишу и найти своего потребителя (например, Oxford Nanopore Technologies). Секвенирование следующего поколения произвело революцию в пищевой микробиологии за счет разработки новых высокопроизводительных технологий, таких как микробиологическое профилирование на основе 16S rRNA и секвенирование методом дробовика, которые были использованы для исследования состава микробиоты различных пищевых продуктов [58].

Метод дробовика. Метод прекращения цепочки секвенирования ДНК (или «секвенирование по Сэнгеру») может использоваться только для довольно коротких нитей от 100 до 1000 пар оснований. Более длинные последовательности фрагментируются на более мелкие фрагменты, которые могут быть секвенированы отдельно, а затем они повторно собираются для получения общей последовательности. Для этого используются два основных метода: праймер-опосредованная прогулка (или «прогулка по хромосоме»), при которой праймер продвигается вперед по всей цепочке «шаг за шагом», и метод дробовика, который является более быстрым, но более сложным процессом, и использует случайные фрагменты [65]. Метод дробовика заключается в том, что ДНК разбивается случайным образом на многочисленные мелкие фрагменты, которые секвенируются с использованием метода обрыва цепи. Исходную последовательность восстанавливают при помощи компьютерного анализа перекрывающихся ридов [66].

Технология секвенирования методом дробовика была использована группой американских ученых в качестве инструмента для обнаружения патогенных бактерий в образцах, взятых с разных этапов обработки производства говядины [87]. Метод с

использованием FPP. Он был разработан итальянскими учеными на базе лаборатории пробиогеномики Пармского университета. Они разработали новый метод обнаружения возбудителей болезней пищевого происхождения, основанный на параллельном секвенировании множественных ампликонов, подход, который разительно отличается от метода микробиологического профилирования на основе 16S rRNA, поскольку последний опирается на секвенирование одного гена. Этот новый подход к обнаружению возбудителей болезней пищевого происхождения основан на комплексе праймеров под названием «панель пищевых патогенов» (FPP), которая генерирует специфические ампликоны, предназначенные для секвенирования на платформе Illumina. Подход FPP предназначен для отслеживания возбудителей болезней пищевого происхождения в естественно загрязненных пищевых образцах [88]. Метод ddPCR. Метод ddPCR представляет собой биотехнологическое усовершенствование обычных методов полимеразной цепной реакции, которые могут быть использованы для непосредственного количественного определения и клонирования амплификации нитей нуклеиновых кислот, включая ДНК, кДНК или РНК [90]. Ключевое различие между ddPCR и традиционной PCR заключается в способе измерения количества нуклеиновых кислот. Первый из них является более точным методом, хотя также более подвержен ошибкам в руках неопытных пользователей. PCR выполняет одну реакцию на один образец. ddPCR также выполняет одну реакцию в пробе, однако, образец разделяют на большое количество частей и реакцию проводят в каждой части индивидуально. Это разделение позволяет получить более достоверный результат и более чувствительное измерение количества нуклеиновой кислоты [69]. На данный момент этот метод был применен для анализа генетически модифицированных организмов в кормах для животных, обнаружения и количественного определения патогенных бактерий, таких как *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* и *Listeria monocytogenes* в окружающей среде [71], мониторинга динамики микробных популяций в почвах с различным уровнем

популяций [72]. 3.2. Использование высокопроизводительного анализа ДНК для контроля качества молочной и масложировой продукции. Загрязнение молочных продуктов при транспортировке, обработке или хранении патогенными для человека микроорганизмами, такими как *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Salmonella enterica*, часто приводит к тяжелым болезням пищевого происхождения [78]. Молочные продукты характеризуются малым сроком годности, поскольку они являются прекрасной средой для выращивания широкого спектра микроорганизмов [79]. Стафилококковое пищевое отравление является одним из самых распространенных во всем мире, а молочные и молочнокислые продукты обычно связаны со вспышками этого заболевания. Один нанограмм стафилококкового энтеротоксина на грамм загрязненной пищи может вызывать симптомы пищевого отравления. Обнаружение контаминации пищевых продуктов болезнетворными микроорганизмами на стадиях производства имеет важное социальное значение. Так в Эфиопии, регионе Тиграй, в котором наблюдается высокое распространение энтеротоксигенного *S. aureus*, в 2016 году было проведено исследование распределения генов стафилококковых энтеротоксинов. При помощи секвенирования гена стафилококкового белка А (*sra*) в сыром коровьем молоке и молочных продуктах из 549 образцов молочной продукции 160 (29,1 %) были положительными для *S. aureus* [80]. Исследователи из Пакистана, где загрязнение продуктов питания различными микроорганизмами является повсеместной и серьезной проблемой, провели работу, направленную на то, чтобы изолировать и охарактеризовать загрязняющие бактерии из местного переработанного масла, основного продукта молочной промышленности в стране. Им удалось выделить и определить штамм *Enterococcus faecium* из коммерческого образца сливочного масла. Штамм был идентифицирован путем секвенирования последовательностей 16S и 23S рРНК генов [81]. Помимо загрязнения пищевых продуктов патогенными микроорганизмами, актуальна проблема роста микроорганизмов, вызывающих нежелательные

реакции, которые ухудшают вкус, запах, цвет и сенсорные и текстурные свойства продуктов [82]. В связи с глобализацией торговли продуктами питания важной задачей производителей становится продление срока хранения продуктов. Споры и термофильные бактерии способны вызывать порчу продуктов питания и создают проблемы, связанные с безопасностью продукта [83]. Знание состава микробиома пищи имеет большое значение для определения безопасности и качества пищевого продукта. Секвенирование нового поколения (NGS) представляет собой интересный подход к пищевой микробиологии, позволяющий определять микробное сообщество непосредственно в образцах пищи [64]. Конкурентная борьба между производителями привела к устойчивым Derevshchikova M.I. et al. Food Processing: Techniques and Technology, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 87–113 96 техническим улучшениям и снижению затрат почти на всех платформах NGS. Это позволило широко использовать эти технологии и обеспечить более полное описание микробного сообщества, его взаимодействие и эволюцию [84]. Итальянские ученые при помощи NGS на базе Illumina, определили состав микробного сообщества сыра Ricotta и продемонстрировали наличие большой популяции спорообразующих бактерий, которая является основной причиной порчи продуктов до истечения предполагаемого срока годности. Штамм, принадлежащий группе *Bacillus cereus*, был идентифицирован в образцах сыра и являлся причиной быстрой порчи продукции. Также обнаружили, что споры *Bacillus cereus* были занесены из сырья, такого как сыворотка, и в сыре Ricotta нашли идеальные условия для прорастания и роста. Тепловая обработка при производстве и пастеризации могла поспособствовать активизации прорастания [85]. NGS обеспечивает представление о составе микробных популяций и показывает, что улучшение и применение таких методов в пищевой микробиологии может быть отличным способом для детального анализа микробиологического качества пищи. Идентификация критических этапов производственного процесса может иметь большое значение для контроля микробной нагрузки и предлагать решения для

безопасного производства продуктов питания [85]. 4. Анализ нормативной и методической литературы. Технические регламенты Таможенного союза разработаны с целью установления единых обязательных для применения и исполнения требований для масложировой и молочной продукции на единой таможенной территории Таможенного союза (Республика Беларусь, Республика Казахстан, Российская Федерация) и для обеспечения свободного перемещения выпускаемой продукции на данной территории Таможенного союза. Основная цель – организация требований безопасности к качеству сырья, упаковки и выпускаемой продукции. Основные нормативнометодические литературные источники, касающиеся санитарно-микробиологических исследований пищевых субстратов это: ГОСТы, нормирующие микробиологические показатели молочной и масложировой продукции и методическая литература по определению микроорганизмов в продуктах питания. В техническом регламенте прописаны единые нормы, в частности микробиологические показатели. Имеется 3 основных технических регламента применимых к безопасности молочных и масложировых продуктов: – ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции»; – ТР ТС 024/2011 «Технический регламент на масложировую продукцию»; – ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям безопасности включают в себя следующие группы микроорганизмов: 1. санитарно-показательные, к которым относятся количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформы), бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, энтерококки; 2. условно-патогенные микроорганизмы, к которым относятся *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, бактерии рода *Proteus*, *B. cereus* и сульфитредуцирующие клостридии, *Vibrio parahaemolyticus*; 3. патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*, бактерии рода *Yersinia*; микроорганизмы порчи, к которым относятся дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы; 4.

микроорганизмы заквасочной микрофлоры и пробиотические микроорганизмы (молочнокислые микроорганизмы, пропионовокислые микроорганизмы, дрожжи, бифидобактерии, ацидофильные бактерии и другие) в продуктах с нормируемым уровнем биотехнологической микрофлоры и в пробиотических продуктах. Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу – нормируется масса продукта, в котором не допускаются бактерии группы кишечных палочек, большинство условнопатогенных микроорганизмов, а также патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*. В других случаях норматив отражает количество колониеобразующих единиц в 1 см (г) продукта (КОЕ/см (г)). ГОСТы, нормирующие микробиологические показатели молочной и масложировой продукции: – ГОСТ 31450-2013 «Молоко питьевое. Технические условия». Настоящий стандарт распространяется на упакованное в потребительскую тару после термической обработки или термообработанное в потребительской таре питьевое молоко, изготавливаемое из коровьего сырого молока и/или молочных продуктов, и предназначенное для непосредственного использования в пищу. Контроль микроорганизмов осуществляется: для КМАФАнМ, БГКП (колиформы) – по ГОСТ 9225 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для *S. aureus* – по ГОСТ 30347 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 30519 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для листерий *L. monocytogenes* – по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт. – ГОСТ 31981-2013 «Йогурты. Общие технические условия». Деревщикова М. И. [и др.] Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48. № 4 С. 87–113 97 В данном стандарте даются определения: «йогурт», «биойогурт» и «обогащенный

йогурт», а также нормируются микробиологические патаметры йогуртов. Определение микробиологических показателей осуществляется: для бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для дрожжей и плесеней – по ГОСТ 10444.12 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для бактерий рода *Salmonella* – по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для молочнокислых микроорганизмов – по ГОСТ 10444.11 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для бифидобактерий – по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт. – ГОСТ 31452-2012 «Сметана. Технические условия». Настоящий стандарт распространяется на упакованную в потребительскую тару сметану, изготавливаемую из сливок коровьего молока с добавлением молочных продуктов или без их добавления, и предназначенную для непосредственного использования в пищу. Определение микробиологических показателей осуществляется: для бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для дрожжей и плесеней – по ГОСТ 10444.12 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для бактерий рода *Salmonella* – по ГОСТ 30519 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для молочнокислых микроорганизмов – по ГОСТ 10444.11 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт. – ГОСТ 31453-2013 «Творог. Технические условия». В настоящем стандарте применен следующий термин с

соответствующим определением: творог – кисломолочный продукт, произведенный с использованием заквасочных микроорганизмов – лактококков или смеси лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков и методами кислотной или кислотно-сычужной коагуляции белков с последующим удалением сыворотки путем самопрессования и/или прессования. Определение микробиологических показателей регламентируется теми же нормативными документами, что и ГОСТ 31452-2012 и ГОСТ 31981-2013 (см. выше). – ГОСТ Р 52686-2006 «Сыры. Общие технические условия». Настоящий стандарт распространяется на сыры и сырные продукты, предназначенные для непосредственного употребления в пищу или дальнейшей переработки. Определение микробиологических показателей осуществляется: для бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 30519; для *Listeria monocytogenes* – по ГОСТ Р 51921 и МУК 4.2.1122-2002. – ГОСТ Р 53512-2009 «Продукты сырные. Общие технические условия». Настоящий стандарт распространяется на сырные продукты, предназначенные для непосредственного употребления в пищу или дальнейшей переработки. Определение микробиологических показателей осуществляется по тем же нормативным документам, что и в ГОСТ Р 52686-2006. – ГОСТ 32261-2013 «Масло сливочное. Технические условия». Настоящий стандарт распространяется на сливочное масло, изготовляемое из коровьего молока и/или молочных продуктов и побочных продуктов переработки молока, предназначенное для непосредственного употребления в пищу, кулинарных целей и использования в других отраслях пищевой промышленности. Определение микробиологических показателей осуществляется: для мезофильных аэробных и факультативноанаэробных микроорганизмов и бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 30519; для плесневых грибов и дрожжей – по ГОСТ 10444.12; для *Listeria monocytogenes* – по нормативным документам, действующим на

территории государства, принявшего стандарт. – ГОСТ 31761-2012 «Майонезы и соусы майонезные. Общие технические условия (с Поправкой)». Настоящий стандарт распространяется на майонезы и майонезные соусы, представляющие собой эмульсионные продукты, изготовленные из пищевых растительных масел и воды, с добавлением эмульгирующих и вкусовых ингредиентов, подкислителей и других пищевых добавок. Определение микробиологических показателей осуществляется: для дрожжей и плесневых грибов – по ГОСТ 10444.12; для бактерий группы кишечной палочки – по ГОСТ 9225, ГОСТ 31747; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 31659. – ГОСТ 1129-2013 «Масло подсолнечное. Технические условия (с Поправкой)». Настоящий стандарт распространяется на подсолнечное масло, предназначенное для непосредственного употребления в пищу, производства пищевых продуктов, в том числе для детского питания и промышленной переработки. Derevshchikova M.I. et al. Food Processing: Techniques and Technology, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 87–113 98 Определение микробиологических показателей осуществляется по нормативному документу, действующему на территории государства, принявшего стандарт. ГОСТы по применению молекулярногенетических методов при анализе пищевой продукции: – ГОСТ 20837-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Требования к подготовке образцов для качественного обнаружения». В настоящем стандарте приводятся критерии и примеры подготовки образцов для получения ПЦР-совместимых образцов или нуклеиновых кислот, качество и количество которых достаточны для использования в ПЦР. В стандарте описаны общие принципы процесса подготовки образцов. Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, а также в случае необходимости при некоторой адаптации применим к кормам и к пробам окружающей среды. – ГОСТ 22118-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для

обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Технические характеристики». Настоящий стандарт устанавливает минимальные требования к характеристикам для обнаружения последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) молекулярными методами. Настоящий стандарт распространяется на обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и, полученных из них, изолятах с помощью методов молекулярного обнаружения, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Настоящий стандарт применим также для обнаружения патогенных микроорганизмов в пробах из окружающей среды и кормов для животных. – ГОСТ 22119-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения». Настоящий стандарт определяет условия для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и, полученных из них, изолятов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Настоящий стандарт также определяет требования к амплификации и обнаружению последовательности нуклеиновых кислот (ДНК или РНК после обратной транскрипции) при проведении ПЦР в реальном времени. Минимальные требования, изложенные в настоящем стандарте, являются основой для сопоставления и воспроизведения результатов в отдельных лабораториях и между различными лабораториями. Настоящий стандарт также применим, например, для обнаружения пищевых патогенных микроорганизмов в пробах окружающей среды и кормов для животных. – ГОСТ 52833-2007 «Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения». Настоящий стандарт устанавливает общие требования и определения для амплификации последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) *in vitro*. Стандарт может быть применен для испытаний пищевых продуктов, кормов для животных и, полученных из них изолятов на наличие

патогенных микроорганизмов с использованием полимеразной цепной реакции. Минимальные требования, установленные в настоящем стандарте, предназначены для обеспечения сопоставимости и воспроизводимости результатов, полученных в разных лабораториях. – ГОСТ Р 56919-2016 «Организация испытаний ПЦР-наборов, используемых для идентификации целевых таксонов микрофлоры, растений и генетически модифицированных организмов. Требования к качеству, безопасности, транспортированию и хранению». Настоящий стандарт распространяется на ПЦР-наборы, предназначенные для идентификации и используемые при амплификации нуклеиновых кислот методом ПЦР, организацию их испытаний и тестирования, и устанавливает требования к организации испытаний и тестирования ПЦР-наборов, предназначенных для идентификации микрофлоры, растений ГМО, контроля качества методов амплификации нуклеиновых кислот, использующих ПЦР. Методическая литература по определению микроорганизмов в продуктах питания: – МУК 4.2.1122-2002 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах». В данных методических указаниях описывается метод, а также необходимое оборудование и реактивы для идентификации бактерии *Listeria monocytogenes* в продуктах питания. – МР 2.3.2.2327-08 «Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов)». В данном пособии описываются методы и подходы по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности, а также необходимое оборудование и расходные материалы для проведения микробиологического контроля. – МУК 4.2.3261-15 «Определение количества микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом наиболее вероятного числа с применением автоматического экспрессанализатора». Деревщикова М. И. [и др.] Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48. № 4 С. 87–113 99 Данные методические указания устанавливают

порядок количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом наиболее вероятного числа с применением автоматического экспресс-анализатора. – МУК 4.2.3262-15 «Обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом ферментсвязанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора». Данные методические указания устанавливают порядок обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом ферментсвязанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора. – МУК 4.2.2872-11 «Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией». В данных методических указаниях описываются методы и подходы, необходимое оборудование и расходные материалы для идентификации патогенных микроорганизмов в продуктах питания с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. – МУК 4.2.2321-08 «Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах». В данных методических указаниях описывается метод, а также необходимое оборудование и реактивы для идентификации бактерий рода *Campylobacter* в продуктах питания.

5. Анализ технических решений, раскрытых в источниках патентной литературы. Существует большое количество классических и инструментальных методов оценки содержания и активности микроорганизмов [119]. Однако почти все из них предназначены для анализа клеток в жидких средах. Только немногие методы позволяют характеризовать численность и состояние микроорганизмов на поверхности материалов. В этих условиях одним из традиционно используемых подходов для оценки микробной загрязненности объектов является взятие смывов микроорганизмов с поверхностей с последующим их анализом прямыми и косвенными методами. Прямые способы анализа дают абсолютное значение содержания микроорганизмов. Среди прямых методов анализа в лабораторной

практике широко применяются способы посева и культивирования микроорганизмов на поверхности агаризованных питательных сред. Данные методы просты, высокочувствительны, не требуют измерительного оборудования, поэтому используются на производстве и в арбитражных случаях. Основные недостатки способов культивирования связаны с высокой длительностью и трудоемкостью, большим расходом питательных сред и экономической неэффективностью при большом количестве микробиологических испытаний. В настоящее время прослеживается тенденция их замены на инструментальные методы. Косвенные методы микробиологического анализа характеризуют содержание и активность микроорганизмов. Они быстры, точны, имеют низкие трудозатраты и экономически эффективны при увеличении количества измерений. Эти способы нуждаются в инструментальных средствах измерений и дают относительное значение показателей, что требует проведения процедуры калибровки средств измерений с помощью прямых методов микробиологического анализа. Метод культивирования заключается в следующем: образец пищевого продукта размачивают или гомогенизируют, используя гомогенизатор или блендер, и приготавливают соответствующие разбавления, которые высевают на селективные или полуселективные среды для последующего выделения и идентификации колоний. Численность ассоциируемых с порчей молочнокислых бактерий обычно оценивают путем подсчета колоний. В патенте RU2203317 (C2) – 20030427 описывается способ обнаружения *Bacillus anthracis* в молоке, включающий культивирование исследуемой пробы с последующим учетом выросших колоний. Исследуемую пробу предварительно смешивают со смесью полимиксина М-сульфата 250 мкг/мл и триметоприма 100–120 мкг/мл в равных пропорциях, подращивают в течение 4–6 ч при 37 °С, затем центрифугируют при 5–5,5 тыс. об/мин в течение 30–40 мин. Культивирование верхнего слоя подращенной пробы ведут на дифференциально-диагностической среде в течение 18–20 ч при 37 °С, а учет выросших колоний осуществляют в парах аммиака. В патенте

RU2264467 (C2) – 20051120 описывается способ обнаружения бактерий группы кишечных палочек. Изобретение относится к биотехнологии, в частности к методам санитарномикробиологического контроля производства продуктов животного происхождения, и может быть использовано в молочной и мясоперерабатывающих отраслях промышленности. Способ заключается в том, что для обнаружения бактерий группы кишечных палочек в пробе по изменению цвета жидкой питательной среды для бактерий использует смесь среды КОДА или ХБ и католита с pH 7–9 и окислительно-восстановительным потенциалом – 370 мВ при соотношении объемов 1 : (0,5–1,0), а определение изменения цвета с зеленого на желтый ведут после выдерживания пробы в течение 5–8 ч при температуре 18–25 °С. Изобретение позволяет значительно сократить продолжительность обнаружения БГКП при одновременном снижении температуры при анализе. В патенте RU2276190 (C2) – 20060510 описывается экспрессный способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей в анализируемой пробе, согласно которому пробу смешивают с реактивом, включающим в себя Derevshchikova M.I. et al. Food Processing: Techniques and Technology, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 87–113 100 0,1–0,8 % раствор люминола в щелочи с pH 9,0–13,0 в 100 см³ которого добавляют 0,3–1,0 см³ 30 % перекиси водорода в кювете анализатора жидкостей хемилюминесцентного ЛИК, регистрируют параметры хемилюминесценции: максимальную ее интенсивность (A_m), время достижения максимума хемилюминесценции (t_m) и площадь по кривой хемилюминесценции (S), по совокупности значений которых устанавливают наличие в пробе микроскопических грибов, бактерий и дрожжей. Данный способ может быть использован в медицине, фармацевтике, пищевой и легкой промышленности, в сельском хозяйстве, нефтедобывающей промышленности и при защите сырья, материалов и изделий из них от микроорганизмов. В заявке на изобретение RU97108375(A) – 1999-04-27 описывается способ обнаружения и идентификации микроорганизмов преимущественно в пищевых продуктах путем культивирования клеток на селективных питательных средах с

одновременным измерением электрической проводимости среды культивирования и регистрацией изменения электрической проводимости среды во времени. При достижении значения электрического сопротивления среды культивирования, соответствующего концентрации клеток $n \times 10^5 - n \times 10^6$ клеток/мл, осуществляют отбор пробы субстрата, которую гидролизуют и метилируют до образования эфиров жирных кислот с последующим анализом полученных эфиров жирных кислот методом газовой хроматографии. Культивированию на селективных средах подвергают несколько образцов контролируемых материалов в отдельных сосудах. Отбор проб субстрата для последующего газохроматографического анализа производят только из тех сосудов, для которых регистрируемое изменение электрической проводимости среды культивирования имеет вид логарифмической кривой роста. Известен способ обнаружения присутствия термостойких микроорганизмов в пищевом продукте, включающий следующие стадии (RU2608653 (C2) – 20170123; AU2011373434 (B2) – 20160526; BR112014001246 (A2) – 20170613; DK2737076 (T3) – 20160613; EP2737076 (B1) – 20160302; NZ620009 (A) – 20160129; US2014147882 (A1) – 20140529; WO2013010574 (A1) – 20130124): – помещения аликвоты продукта в сосуд, образующий удерживающую камеру и содержащий оптический зонд чувствительный к метаболиту термостойких микроорганизмов, где метаболитом термостойких микроорганизмов является кислород и где оптический зонд является чувствительным к кислороду фотолюминесцентным красителем; – пастеризации аликвоты в сосуде; – инкубирования пастеризованной аликвоты в сосуде в течение периода инкубации; – периодического обращения к зонду во время периода инкубации, отличающийся тем, что в ходе таких обращений измеряют изменения концентрации метаболита термостойких микроорганизмов в аликвоте в зонде. Эти изменения концентрации указывают на присутствие жизнеспособных термостойких микроорганизмов в аликвоте. Возможно, что дополнительно проводят преобразование измеренных произошедших в зонде изменений в

концентрацию термостойких микроорганизмов в пастеризованной аликвоте перед инкубированием с помощью алгоритма преобразования и регистрируют выявленную концентрацию термостойких микроорганизмов. Также возможно, что герметично закрывают аликвоту в удерживающей камере сосуда перед пастеризацией. Изобретением уточняется, что пищевым продуктом может являться молоко, а в качестве сосуда использоваться пробирка, кювета или многолуночный планшет. В заявке на изобретение RU2012109856 (A) – 20131027 описывается способ выделения и идентификации штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* из объектов внешней среды пищевого сырья и пищевых продуктов, включающий селективные среды и специфичные тесты бактериологической дифференциации. Процесс идентификации включает схему бактериологического выделения и использование специфичного бактериофага, что позволяет выделять и идентифицировать, в том числе штаммы, лишенные пигментов. В заявке на изобретение RU2012139912 (A) – 20140327 описывается способ количественного определения хитина методом иммуноферментного анализа в качестве общего маркера контаминации или поражения плесневыми грибами продуктов питания, почвы, строительных конструкций и биологических материалов (кровь или растения), заключающийся в обработке экстрагированного субстрата ферментом хитиназой с последующим взаимодействием со специфичными антителами к хитину, отличающийся тем, что применен новый принцип определения плесневых грибов, позволяющий идентифицировать с высокой точностью присутствие плесневых грибов в образце вне зависимости от видовых отличий микромицетов, а также от фазы их роста и морфологических особенностей. ДНК-методы идентификации включают секвенирование последовательностей 16S или 23S рДНК, ПЦР-анализы с применением родоили видоспецифических праймеров, а также методы ДНК-фингерпринтинга, основанные на структурах ПЦР-амплифицированных фрагментов ДНК или на рестрикционных анализах всей ДНК или ампликонов, полученных с помощью селективной ПЦР

(полиморфизм длины фрагментов рестрикции, RFLP). В патенте RU2375459 (C1) – 20091210 описывается способ индикации бактерий рода *Lactobacillus*. Способ основан на проведении ПЦР ДНК бактерий рода *Lactobacillus*. Для проведения Деревщикова М. И. [и др.] Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48. № 4 С. 87–113 101 ПЦР используют оригинальные родовые праймеры, соответствующие консервативным участкам генома лактобактерий и амплифицирующие фрагмент генома, который в дальнейшем может быть использован для видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus*. Изобретение позволяет повысить специфичность способа индикации бактерий рода *Lactobacillus* на основе ПЦР фрагмента генетической детерминанты 16 S рРНК. Изобретение может быть применено в научных исследованиях для получения новых знаний о биологических свойствах бактерий рода *Lactobacillus*, для изучения природных биотопов обитания и характера распространения этих бактерий и представляет практический интерес для использования в системе контроля качества продуктов питания, обогащенных лактобациллами, как на предприятиях-изготовителях, так и в учреждениях Роспотребнадзора. В патенте RU2395583 (C2) – 20100727 описывается способ детекции живых клеток микроорганизма путем дифференцирования живых клеток от мертвых клеток или поврежденных клеток в тестируемом образце. В одном варианте исполнения изобретения способ включает следующие стадии: – обработку тестируемого образца ядом топоизомеразы или ядом ДНК-гиразы; – экстракцию ДНК из тестируемого образца и амплификацию мишеневого участка экстрагированной ДНК методом ПЦР, где длина мишеневого участка составляет от 900 до 3000 нуклеотидов; – анализ продукта амплификации. При этом возможно, что продукт амплификации анализируют с помощью стандартной кривой, отражающей зависимость количества продукта амплификации от количества микроорганизма, которую получают с использованием стандартных образцов микроорганизма и ПЦР проводят в режиме реального времени одновременно с анализом продукта

амплификации. В другом варианте изобретения длина мишеневого участка составляет от 100 до 3000 нуклеотидов. В качестве тестируемого образца используют молоко, молочный продукт, пищевой продукт, полученный с использованием молока или молочного продукта в качестве сырья, образец крови, образец мочи, образец спинномозговой жидкости, образец синовиальной жидкости и образец плевральной жидкости, а микроорганизм представляет собой бактерию. Мишеневый участок может представлять собой ген рРНК 23S. ПЦР проводят с использованием набора праймеров, содержащего праймеры SEQ ID NO: 1 и 2, или набора праймеров, содержащего праймеры SEQ ID NO: 3 и 4. Изобретение (RU2410440 (C1) – 20110127; AU2008287928 (B2) – 20110728; CA2666448 (C) – 20130910; CN101617057 (B) – 20131030; EP2077334 (B1) – 20151014; JP4378537 (B2) – 20091209; JPWO2009022558 (A1) – 20101111; KR101120270 (B1) – 20120306; NZ576113 (A) – 20120525; US8221975 (B2) – 20120717; US2012277121 (A1) – 20121101; WO2009022558 (A1) – 20090219) раскрывает способ детектирования живой клетки микроорганизма в тест-пробе, предусматривающий стадии: – добавления сшивающего агента, способного сшивать ДНК при облучении светом, имеющим длину волны 350–700 нм к этой тест-пробе; – облучения тест-пробы, к которой добавлен сшивающий агент, светом, имеющим длину волны 350–700 нм; – удаления сшивающего агента, содержащегося в тест-пробе, облученной светом; – добавления среды к тест-пробе, из которой удален сшивающий агент, и инкубации этой тест-пробы; – добавления опять сшивающего агента, способного сшивать ДНК при облучении светом, имеющим длину волны 350–700 нм, к инкубированной тест-пробе; – облучения тест-пробы, к которой добавлен сшивающий агент, светом, имеющим длину волны 350–700 нм; – экстракции ДНК из этой тест-пробы и амплификации района-мишени экстрагированной ДНК при помощи способа амплификации нуклеиновых кислот; – анализа амплифицированного продукта. Предпочтительно анализировать амплифицированный продукт на основе калибровочной кривой, которая получена с использованием стандартной

пробы этого микроорганизма и показывает зависимость между количеством этого микроорганизма и амплифицированного продукта. Также предпочтительно использовать способ ПЦР, LAMP, SDA, LCR или способ микроматрицы ДНК в качестве способа амплификации нуклеиновых кислот. ПЦР выполняют с использованием ПЦР реального времени и выполняют одновременно ПЦР и анализ амплифицированного продукта. Тест-пробой является пищевой продукт, проба крови, проба мочи, проба спинальной жидкости, проба синовиальной жидкости, проба плеврального выпота, промышленная вода, водопроводная вода, грунтовая вода, речная вода или дождевая вода. Микроорганизм представляет собой патогенную бактерию, а районом-мишенью является патогенный ген. В охранных документах (RU2435865 (C2) – 20111210; CA2639069 (A1) – 20070726; CN101405411 (A) – 20090408; EP1984520 (B1) – 20131211; GB0601302 (D0) – 20060301; GB0701298 (D0) – 20070228; GB2434644 (A) – 20070801; JP5650887 (B2) – 20150107; SG169342 (A1) – 20110330; UA100495 (C2) – 20130110; US2009306230 (A1) – 20091210; US2016108467 (A1) – 20160421; WO2007083147 (A3) – 20071221) описывается способ обнаружения наличия микроорганизмов в Derevshchikova M.I. et al. Food Processing: Techniques and Technology, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 87–113 102 биологическом образце. Согласно изобретению способ предусматривает использование диагностической мультиплексной панели (DMP), созданной для одновременной идентификации совокупности возможных микроорганизмов, которые могут присутствовать в биологическом образце, с применением реакции удлинения праймеров в отношении высококонсервативных нуклеотидных последовательностей в тестируемых микроорганизмах. Биологический образец иммобилизуют на твердом субстрате в первом местоположении, затем переносят в другое местоположение и осуществляют стадию экстракции на твердом субстрате таким образом, чтобы экстрагировалась ДНК любого микроорганизма, присутствующего в пробе. Затем проводят амплификацию нуклеиновой кислоты на экстрагированных

ДНК микроорганизмов, затем смешивают целевые последовательности с праймерами с применением DMP. В результате определяют генотип любых присутствующих микроорганизмов и идентифицируют искомые микроорганизмы. Для осуществления способа используют диагностическую мультиплексную панель (DMP), пригодную для генотипирования патогенных микроорганизмов и набор для тестирования микроорганизмов. Использование изобретения позволяет произвести надежный отбор биологических образцов и их тестирование, обеспечивая при этом одновременное тестирование множества микроорганизмов. В зависимости от назначения диагностической мультиплексной панели (DMP) биологический образец можно получать от человека, животного, из растения или пищевого продукта. В последнем случае предполагается, что DMP предназначена для определения загрязнения пищевого продукта патогенами, передающими заболевание алиментарным путем. В патенте RU2460801 (C1) – 20120910 описывается способ выявления санитарнопоказательных бактерий и стартовых культур в мясных продуктах. Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в микробиологии. Способ включает приготовление среды обогащения по прописи, контроль pH, стерилизацию, выявление санитарно-показательных бактерий и стартовых культур в мясных продуктах и их идентификацию. Для приготовления среды по прописи в 950 мл дистиллированной воды растворяют 10,00 г пептона, 5,00 г мясного экстракта, 5,00 г дрожжевого экстракта, 1,00 г твина-80, 3,00 г натрия фосфорнокислого, 0,10 г магния сернокислого, 0,01 г железа сернокислого. Среду стерилизуют при 1,1 атм. в течение 15 мин. Далее, в 50 мл дистиллированной воды растворяют 20,00 г глюкозы. Полученный 40 % раствор глюкозы стерилизуют при 0,5 атм. в течение 20 мин, затем в асептических условиях добавляют к среде и перемешивают. Для выделения санитарно-показательных бактерий и стартовых культур в стерильных условиях отбирают 25 г образца мясного продукта и помещают в колбу, содержащую 250 мл среды, затем инкубируют при 37 °С в течение 16 ч. Далее, бактерии отделяют от среды

центрифугированием при 4000 об/мин, отмывают от остатков питательной среды физиологическим раствором и вновь центрифугируют при 4000 об/мин. Из полученных бактериальных клеток выделяют геномную ДНК и идентифицируют с помощью ПЦР-анализа с электрофоретической схемой детекции с использованием родо- и видоспецифических праймеров для каждого микроорганизма. Изобретение обеспечивает комплексное выделение как санитарно-показательных бактерий, так и стартовых культур. В охранных документах (RU2526576 (C2) – 20140827 и WO2013100810 (A3) – 20131031) описывается способ идентификации лактобацилл. Представленный способ основан на комбинации и полиморфизме генов токсин-антитоксин суперсемейств RelBE и MazEF и характеризуется тем, что для идентификации проводят амплификацию геномных ДНК с использованием набора олигонуклеотидов определенной структуры, ПЦР-продукты анализируют в агарозном геле, а размер полученного фрагмента определяют с помощью ДНК-маркера. Исследуемый штамм относят к определенной группе, виду или штамму в случае наработки фрагментов при использовании определенных олигонуклеотидов. Представленное изобретение может быть использовано для идентификации штаммов лактобацилл в микробиоте человека, продуктах питания, а также для определения исследуемого штамма в клинических пробах или молекулярного отслеживания в коммерческих препаратах. В охранных документах (RU2567011 (C2) – 20151027; BR112012024873 (A2) – 20161206; CA2794466 (A1) – 20111006; CN102939390 (B) – 20160518; EP2553120 (B1) – 20150422; ES2543172 (T3) – 20150817; JP2013523118 (A) – 20130617; KR20130062276 (A) – 20130612; PT105029 (B) – 20120911; US2013102000 (A1) – 20130425; WO2011121544 (A4) – 20111201) описывается зонд пептидно-нуклеиновой кислоты (PNA-зонд) для обнаружения *Salmonella*, содержащий последовательность SEQ ID № 1-5'- AGG AGC TTC GCT TGC-3. Утверждается, что такой PNA-зонд способен обнаруживать последовательность-мишень в рПНК, рДНК или последовательности, комплементарные рПНК *Salmonella*. Он связывается с одной из

обнаруживаемых фракций, выбранной из одной из следующих групп: конъюгата, системы обнаружения разветвленной фракции, хромофора, флуорофора, радиоизотопа, фермента, гаптена или люминесцентного компонента. Флуорофорная группа может представлять собой, по меньшей мере, одну из следующих: флуорофоры серии Alexa, серии Alexa Fluor, цианины, 5-(и -6) Деревщикова М. И. [и др.] Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48. № 4 С. 87–113 103 карбокси-2',7'-дихлорфлуоресцеин, 5-ROX (5-карбокси-X-родамина триэтиламмониевую соль). Также в изобретении описывается набор для обнаружения *Salmonella*, который содержит PNA-зонд и, по меньшей мере, один из следующих растворов: один раствор для фиксации, один раствор для гибридизации и один раствор для промывки. Способ обнаружения *Salmonella* содержит следующие стадии: – контактирования PNA-зонда с биологическими пробами; – гибридизации PNA-зонда с последовательностью мишенью микроорганизмов, присутствующих в указанных пробах; – обнаружения гибридизации в виде показания указанного обнаружения и количественного анализа указанных проб. При этом биологическую пробу получают из крови, воздуха, пищевого продукта, воды или биопсий. В патенте RU2569196 (C1) – 20151120 предложен способ определения наличия в биологических жидкостях, окружающей среде и продуктах питания бактерий *Escherichia coli* штамма O157:H7, включающий дезинтеграцию бактерий ферментативной обработкой и лизис неионным детергентом, адсорбцию на парамагнитных частицах при помощи специфического моноклонального антитела, детекцию антигена бактерий *E. coli* O157:H7 при помощи специфического биотинилированного моноклонального антитела, связывание полученного комплекса с нековалентным конъюгатом ДНК-матрицы с нейтравидином, диссоциацию твердофазного комплекса «антитело-антиген *E. coli* O157:H7 – биотинилированное антитело-конъюгат» добавлением раствора глицин HCl pH 2.6, ПЦР-амплификацию ДНК-матрицы и выявление наличия бактерий *E. coli* O157:H7 по скорости нарастания флуоресцентного сигнала. Данный способ

отличается высокой специфичностью и чувствительностью детекции и может быть использован в ранней диагностике геморрагического колита и санитарногигиеническом контроле над наличием его возбудителя. Известен способ детекции живых клеток микроорганизма в тестируемом образце (RU2527897 (C2) – 20140910; AU2010275576 (B2) – 20130228; CA2768699 (C) – 20170822; CN102471768 (B) – 20140723; CN103820578 (B) – 20150617; EP2458002 (B1) – 20150325; JP4825313 (B2) – 20111130; JPWO2011010740 (A1) – 20130107; KR101383389 (B1) – 20140408; MX2012001000 (A) – 20120316; NZ597138 (A) – 20121221; SG177738 (A1) – 20120228; US9394572 (B2) – 20160719; US2016298181 (A1) – 20161013; WO2011010740 (A1) – 20110127) путем отличия живых клеток от мертвых клеток или поврежденных клеток, который включает стадии: – добавления в тестируемый образец средства, способного к ковалентному связыванию с ДНК или РНК при облучении светом с длиной волны 350–700 нм; – облучения тестируемого образца, в который добавляют средство, светом с длиной волны 350–700 нм; – амплификации мишени ДНК или РНК микроорганизма, содержащегося в тестируемом образце, способом амплификации нуклеиновых кислот в присутствии средства подавления действия вещества, ингибирующего амплификацию нуклеиновых кислот, соли магния и соли органической кислоты или соли фосфорной кислоты, без выделения нуклеиновых кислот из клеток; – анализа продукта амплификации. Амплификацию мишени проводят в клетках микроорганизма. Тестируемый образец – продукты питания, биологические образцы, питьевая вода, промышленные воды, вода из окружающей среды, сточные воды, почва, мазки и т.д. В предпочтительные примеры продуктов питания включают: напитки, такие как безалкогольные напитки, газированные безалкогольные напитки, жидкие пищевые добавки, напитки на основе фруктовых соков и молочнокислые напитки (включая концентраты и порошки этих напитков); мороженые кондитерские изделия, такие как мороженое, фруктовое мороженое и ледяная стружка; молочные продукты, такие как переработанное

молоко, молочные напитки, молочнокислые продукты и масло; энтеральное питание, жидкая пища, молоко для младенцев, спортивные напитки; функциональное питание, такое как питание для применения при определенном состоянии здоровья, пищевые добавки и т.д. В заявке на изобретение RU97119187 – 1999-10-27 описывается олигонуклеотидный праймер, способ идентификации вида организма, геномный полинуклеотидный локус, набор для выделения ДНК-мишени. Согласно изобретению выделенный олигонуклеотидный праймер для идентификации вида организма, гибридизующийся с полинуклеотидной молекулой-мишенью, имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: 5'-GTTGTCGTACC(G/A) TCACCAGCAATTTTC-3' (SEQ ID 1) и 5'-AA(G/A) GCGCCTGGTTT (C/T) GGTGAT (C/A) (G/A) (A/T/C/G) (C/A) (G/A)-3' (SEQ ID 2), и последовательностей, комплементарных им. Праймер может представлять собой 5'-GAIIIIGCIGGIGA(T/C)GGIACIACIAC-3' (SEQ ID 3) или 5'-(T/C) (T/G)1(T/C)(T/G)ITCICC(A/G) AAICCGGIGC (T/C) TT-3' (SEQ ID 4). При этом организмом может являться микроорганизм, например, прокариотический – член рода, выбранный из группы, состоящей из *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Chlamidia*, *Helicobacter* и *Streptococcus*. Вид рода может быть выбран из группы, состоящей из *Derevshchikova M.I. et al. Food Processing: Techniques and Technology*, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 87–113 104 *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *E. coli*, *B. subtilis* и *P. aeruginosa*. Способ идентификации вида организма предусматривает амплификацию района геномной нуклеиновой кислоты организма при помощи олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с фланкирующими мишенями 5' и 3' полинуклеотидными последовательностями геномной нуклеиновой кислоты. Полинуклеотидная последовательность-мишенью имеет в основном последовательность, выбранную из группы, состоящей из: 5'-GTTGTCGTACC(G/A) TCACCAGCAATTTTC-3' (SEQ ID 1) и 5'-AA(G/A) GCGCCTGGTTT (C/T) GGTGAT (C/A) (G/A) (A/T/C/G) (C/A) (G/A)-3' (SEQ

ID 2) и последовательностей, комплементарных им, и детектирование амплифицированного района. Амплификация может представлять собой метод ПЦР. Возможно, что геномный локус кодирует полипептид теплового шока. Набор для выделения ДНК-мишени для идентификации вида организма содержит средства для амплификации ДНК-мишени. Эти средства содержат необходимый фермент (ферменты) и олигонуклеотидные праймеры для амплификации ДНК-мишени из организма или клетки организма. В патенте на изобретение RU2350656 (C2) – 20090327 описывается способ определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами при лабораторном контроле. Он включает подготовку проб и их исследование. Подготовка проб проводят в два приема. Во-первых, в зависимости от плотности, жиросодержания и текучести продукта его подвергают соответственно взвешиванию, выделяя 25 г (мл) продукта с последующим измельчением, переводу в жидкую фазу в объеме 50–100 мл посредством добавления физиологического раствора, а при исследовании воды последнюю в количестве 500 мл фильтруют через мембранные фильтры. Во-вторых, деление пробы на части по 2 мл пробы отделяют для исследования методом флюоресцирующих антител (МФА), в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), в реакции агломерации объемной (РАО), иммуноферментным анализом (ИФА), ПЦР и бактериологическим методом, а по 5 мл проб берут для исследования биологическим методом, заражая биопробных животных. Проведение приемов на 25 пробах осуществляют в течение 1,5–2 ч. При этом исследование проб экспрессными или ускоренными методами (МФА, РНГА, РАО, ИФА, ПЦР) проводят в течение 4–10 ч, а исследование биологическим методом – в течение 48–120 ч с использованием селективных питательных сред. Для проведения ПЦР выделяют ДНК микроорганизмов из проб пищевых продуктов, применяя в зависимости от сложности их состава гуанидинтиоцианатный метод или фенольную экстракцию, а затем проводят постановку ПЦР, используя 1–5 мкл раствора содержащего ДНК пробы, с последующим учетом реакции, обеспечивающей чувствительность 2–103

м.к./мл пробы. Известен способ выделения и очистки дезоксирибонуклеиновых кислот (RU2400537 (C2) – 20100927). Сущность способа заключается в том, что, в отличие от прототипа, очистку биологического раствора после лизиса образца в буфере на основе анионного детергента (например, додецил сульфата натрия – SDS) проводят суспензией предварительно отожденного в вакууме детонационного наноалмаза, являющегося гидрофильным сорбентом со слабым положительным зарядом и сильно развитой удельной поверхностью. В результате из раствора удаляются примеси, ингибирующие полимеразную цепную реакцию – пептиды, пигменты, танины, липиды. Последующее центрифугирование раствора позволяет разделить детонационный наноалмаз с адсорбированными примесями и супернатант, содержащий ДНК. Далее ДНК осаждают спиртом (изопропанолом или этанолом) и растворяют в дистиллированной воде. Изобретение относится к области молекулярной биологии, а именно к способу выделения и очистки ДНК из образцов тканей растений, а также продуктов переработки растительного и животного происхождения. Известно изобретение (WO9600298 (A1) – 19960104), позволяющее осуществлять одновременное обнаружение, идентификацию и дифференциацию. Изобретение относится к способу обнаружения и идентификации одного микроорганизма или для одновременного обнаружения нескольких микроорганизмов в образце, включающий стадии: – при необходимости высвобождения, выделения или концентрирования полинуклеиновых кислот, присутствующих в образце; – при необходимости амплифицирование спейсерной области 16S-23S рРНК или ее части с одной подходящей парой праймеров; – гибридизацию полинуклеиновых кислот на первой или второй стадии с одним и предпочтительно более чем одним из спейсерных зондов или их эквивалентами, в соответствующих условиях гибридизации и промывки, и/или с таксоноспецифическим зондом, полученным из любой из спейсерных последовательностей при тех же условиях гибридизации и промывки; – обнаружение гибридов, образованных на третьей стадии, с каждым из зондов,

используемых в соответствующих условиях гибридизации и промывки; – идентификацию микроорганизмов, присутствующих в образце, из сигналов дифференциальной гибридизации, полученных на четвертой стадии. «Образец» может представлять собой любой биологический материал, взятый либо непосредственно от инфицированного человека (или животного), либо после культивирования (обогащения), либо образец, взятый из пищи или корма. Деревщикова М. И. [и др.] Техника и технология пищевых производств. 2018. Т. 48. № 4 С. 87–113 105 Известен способ обнаружения патогенов в пищевых продуктах, объединяющий преимущества специфичности иммунологической детекции с высокой чувствительностью ПЦР (WO9820148 (A1) – 19980514 и US2001008887 (A1) – 20010719). Проведение детекции по данному способу включает в себя следующие этапы: – обогащение образцов по исследуемому бактериальному патогену культивацией на богатой питательной среде; – иммуномагнитную сепарацию патогенных бактерий с использованием парамагнитных частиц, покрытых специфическими антителами, распознающими, связывающими и захватывающими E. coli O157:H7 (Dynabeads anti-E.coli O157:H7, DynalAs, Oslo, Norway или аналогичные); – амплификацию последовательностей ДНК, специфичных для данного патогена, с помощью ПЦР; – детекцию продуктов амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле. С применением данной технологии за период в 8 часов можно провести выявление единичных клеток патогена в пищевых образцах. Преимуществом данного способа является двухэтапное обеспечение специфичности детекции (за счет селекции анализируемых бактерий с помощью высокоспецифичных антител к патогену и за счет использования при ПЦР-амплификации праймеров, специфичных к ДНК бактериипатогена), а также повышение чувствительности определения патогена за счет ПЦР-амплификации, поскольку ПЦР позволяет детектировать даже единичные молекулы ДНК. Однако на практике прямое применение ПЦР для детекции бактериальной ДНК, полученной из сложных биологических образцов, осложнено наличием примесей, ингибирующих

реакцию, а процедура обогащения образцов наращиванием на питательной среде значительно (от 8 часов и более) увеличивает как время проведения детекции, так и вероятность контаминации культуры, полученной от исследуемого образца, что может привести к неточным и малодостоверным результатам. Данная процедура вкупе с примененным способом анализа продуктов амплификации в агарозном геле дает возможность лишь качественно охарактеризовать образцы по наличию патогена и полностью исключает возможность его количественного определения. Изобретение (WO2006136640 (A1) – 20061228; ES2276597 (B1) – 20080616) относится к способу обнаружения и идентификации, особенно в молоке, следов разрушающих бактериофагов видов молочнокислых бактерий (LAB) (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*), которые используются в промышленных молочных ферментациях с использованием мульти-ПЦР. Многократную ПЦР-амплификацию проводят со специфическими олигонуклеотидами праймеров консервативных областей генома вышеупомянутых бактериофагов. Указанные вирусы являются основной причиной сбоев ферментации в молочной промышленности, что приводит к значительным потерям. Способ по изобретению может быть использован для принятия решений, таких как отнесение зараженного молока процессам, которые не связаны с использованием LAB, которые чувствительны к идентифицированным фагам или к процессам инактивации, а также к дезинфекции производственной установки. Основным преимуществом метода является скорость, с которой он может быть выполнен, а также специфичность, простота и чувствительность.

Темы контрольных работ

Молекулярно-генетические методы в ветеринарно-санитарной экспертизе:

1. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для выявления и идентификации возбудителей инфекционных болезней животных вирусной этиологии, обеспечивающих устойчивое ветеринарное благополучие и получение продукции животноводства высокого санитарного качества.
2. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для выявления и идентификации возбудителей инфекционных болезней животных бактериальной этиологии, обеспечивающих устойчивое ветеринарное благополучие и получение продукции животноводства высокого санитарного качества.
3. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК в составе кормов, сырья на всех этапах его переработки, транспортировки, хранения.
4. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК полуфабрикатов, готовых продуктов питания методом полимеразной цепной реакции.
5. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для проведения идентификации и количественного определения каждого компонента.
6. Тест-системы для определения генетически модифицированных организмов (ГМО) в сырье, кормах, пищевой продукции и оценки их безопасности.
7. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для исключения фальсификации нерецептурными компонентами растительного и животного происхождения.
8. Способы детекции продуктов LAMP/RT-LAMP.
9. Преимущества LAMP/RT-LAMP перед ПЦР для молекулярной диагностики.
10. Постгеномные технологии.
11. Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК и РНК.
12. Методы конструирования продуцентов биологически активных веществ: селекция, метод рекомбинантных ДНК, гибридная технология.
13. ДНК-маркеры в изучении пород сельскохозяйственных животных.
14. ДНК-маркеры в изучении пород крупного рогатого скота.
15. ПЦР - имитация естественной репликации ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК\РНК в исследуемом образце.

16. Использование ПЦР для паспортизации животных, диагностики инфекционных, генетических заболеваний, видовой идентификации, диагностики патогенов в пище и генетически модифицированных продуктов.
17. Использование ПЦР для паспортизации животных и видовой идентификации.
18. Использование ПЦР для диагностики инфекционных, генетических заболеваний.
19. Использование ПЦР для диагностики патогенов в пище и генетически модифицированных продуктов.
20. Молекулярно-генетическая идентификация фитопатогенов.
21. Технологии биочипов ДНК-микрочипы в ВСЭ.
22. Преимущества и недостатки генетически модифицированных продуктов.
23. Оценка показателей качества и безопасности ГМ продукции.
24. Технический регламент Таможенного союза в отношении ГМ продукции.
25. Методы оценки токсичности и мутагенности генетически модифицированной продукции.
26. Изучение аллергенных и иммуногенных свойств ГМ пищевых продуктов.
27. Влияние генетически модифицированных растений и животных на окружающую среду.

Критерии оценки:

- оценка «отлично» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 90-100%;
- оценка «хорошо» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 80-90%;
- оценка «удовлетворительно» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 70-80%.

Оформление контрольной работы

Вариант контрольной работы соответствует номеру в списочном составе группы студентов (избирается и выполняется студентом с таким расчетом, чтобы в одной группе темы работ не совпадали).

Работа выполняется в печатном виде, оформляется титульным листом с указанием названия университета, факультета, кафедры, дисциплины и названия темы, а также фамилии и группы студента. Ответ на каждый вопрос темы начинают с новой страницы. Выполнение работы включает в себя подробный план раскрытия темы и развернутый ответ с соответствующими выводами. В конце работы или после каждого раздела приводится список использованной литературы (8-12 источников), оформленный по ГОСТ Р

7.0.5-2008. Список литературы не должен содержать таких источников, как <https://ru.wikipedia.org/>, <https://allbest.ru/>, <https://www.bestreferat.ru/> и т.п.

При оформлении текста контрольной работы используется стандартный формат листа А4 (297 × 210 мм) с односторонним заполнением.

Страницы нумеруются арабскими цифрами в центре или в правом нижнем углу.

Титульный лист включается в общую нумерацию, но номер на нем не прописывается.

Рекомендуется использовать текстовый редактор Microsoft Word, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пт, интервал полутонный.

Абзацный отступ 4 знака (1,25 см). Поля страницы: левое – 3 см, правое – 1,5, верхнее и нижнее – 2 см.

Общий объем контрольной работы не должен превышать 20-25 страниц печатного текста.

Перед проверкой и защитой контрольная работа должна быть зарегистрирована лаборантами кафедры ветеринарной генетики и биотехнологии

Список основной литературы

1. Карманова, Е. П. Практикум по генетике: Учебное пособие / Е. П. Карманова, А. Е. Болгов, В.И. Митюшко. – Санкт-Петербург: Лань, 2018. – 202 с. - Текст : электронный. - URL: <https://e.lanbook.com/reader/book>

Список дополнительной литературы

1. Шокина, Ю.В. Разработка инновационной продукции пищевой биотехнологии. Практикум : учебное пособие / Ю.В. Шокина. — Санкт-Петербург : Лань, 2019. — 116 с. — Текст : электронный. — URL: <https://e.lanbook.com/book>

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

1. Официальный сайт Минсельхоза России <http://www.mcx.ru/>
2. Аграрная российская информационная система <http://aris.ru/>
3. Единый сервисный портал Минсельхоза России <http://service.mcx.ru/Home/RegistersAndRegisters>
4. Россельхознадзор Российской Федерации <http://www.fsvps.ru/fsvps>
5. Управление по этическим проблемам в биотехнологических исследованиях <http://www.hhs.gov/ohrp/>

- 6 Московский государственный университет прикладной биотехнологии (МГУПБ) <http://msaab.n4.biz/>
- 7 Биотехнологический образовательный портал государственного университета Айовы.
<http://www.biotech.iastate.edu/publications/mendel/Module>.
- 8 Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко
<http://viev.ru/>
- 9 Комитет государственной Думы по охране здоровья <http://www.komitet2-2.km.duma.gov.ru>
- 10 Федеральная служба по надзору и сфере защит прав потребителей и благополучия человека <http://rospotrebnadzor.ru>
- 11 Электронно-библиотечная система НГАУ <http://nsau.edu.ru/library/e-catalogue/>
- 12 Электронная библиотечная система издательства «Лань»
www.e.lanbook.com
- 13 Научная электронная библиотека eLibrary.ru www.eLibrary.com
- 14 Электронно-библиотечная система издательства «Инфра-М»
www.znaniium.com

Словарь терминов.

Азотистые основания - основания входящие в состав нуклеиновых кислот.

Аллель – Одна из двух или большего числа альтернативных форм гена, каждой из которых свойственная уникальная последовательность нуклеотидов. Однако обычно различные аллели данного гена распознают по их фенотипическому проявлению, а не путем сравнения нуклеотидных последовательностей.

Аллоферменты (аллозимы). Альтернативные формы ферментов, кодируемые различными аллелями одного и того же локуса.

Амбер-кодон - триплет УАГ в РНК, один из трех бессмысленных кодонов, обуславливающих терминацию белкового синтеза.

Амбер-мутация - любое изменение в ДНК, приводящее к появлению амбер-кодона.

Аминокислоты. Соединения, из которых построены молекулы белков. Всего известно несколько сотен аминокислот, однако в состав белков обычно входит лишь 20 из них .

Амплификация - образование дополнительных копий хромосомных последовательностей, обнаруживаемых в хромосомной или внехромосомной ДНК, увеличение числа копий определённого фрагмента ДНК.

Антикодон - триплет, занимающий определенное и постоянное положение в структуре молекулы тРНК; комплементарно взаимодействует с кодоном (или кодонами) мРНК.

Антитело. Белок, вырабатываемый иммунной системой высших организмов, который специфическим образом связывает молекулы чужеродных веществ (антигены). Синтез антител начинается в ответ на появление в организме антигенов.

Аутосомы – все хромосомы, кроме половых; в диплоидной клетке имеется по две копии каждой аутосомы.

Бактериофаги (фаги) – вирусы, инфицирующие бактерии.

Белок. Полимер, состоящий из одной или нескольких полипептидных субъединиц и обладающий характерной трехмерной структурой, определяемой последовательностью входящих в его состав аминокислотных остатков.

Белок-репрессор – способен связываться с оператором на ДНК или с РНК, предотвращая соответственно транскрипцию или трансляцию.

Бессмысленный кодон – один из трех триплетов, УАГ, УАА, УГА, вызывающих терминацию синтеза белка (УАГ известен как amber-кодон, УАА – как ochre-кодон, УГА – как opal-кодон).

Биотехнология – комплексная многопрофильная область наукотехнического прогресса, включающая разнообразный микробиологический синтез, генетическую и клеточную инженерию, инженерную энзимологию, использование знаний условий и последовательности действия белковых ферментов в организме растений, животных и в промышленных реакторах.

Ведущая цепь – цепь ДНК, синтезирующаяся непрерывно в $5' \rightarrow 3'$ направлении.

Вектор для клонирования – любая плаزمиды или фаг, в которые может быть встроена чужеродная ДНК с целью клонирования.

Вставки (инсерции) – обнаруживаются благодаря присутствию в ДНК дополнительных пар оснований.

Вырожденность генетического кода – соответствие нескольких кодонов одной аминокислоте. Замена в третьем основании кодона не всегда приводит к замене аминокислоты.

Гамета – Зрелая репродуктивная клетка, способная при слиянии с аналогичной клеткой другого пола образовать зиготу и содержащая гаплоидный набор хромосом.

Гаметогенез – процесс развития половых клеток.

Гаплоидный набор хромосом – содержит по одной копии каждой аутосомы и одну половую хромосому; гаплоидное число хромосом (n) является характеристикой гамет.

Гаплотип – совокупность сцепленных генов одной хромосомы, контролирующих аллогруппу.

Гемизиготность – наличие в хромосомном наборе особи только одной аутосомы из пары гомологичных аутосом, одной половой хромосомы (ХО) или пары разных половых хромосом (ХУ).

Гемизиготный ген. Ген, присутствующий в генотипе лишь в одном экземпляре (копии).

Ген - Последовательность нуклеотидов в геноме организма, которой может быть приписана определенная функция, иными словами, ген – это нуклеотидная последовательность, либо кодирующая полипептид, либо определяющая ту или иную транспортную РНК, либо необходимая для правильной транскрипции какого-то другого гена.

Генеративные мутации – мутации, происходящие в половых клетках.

Генетика – наука о наследственности и изменчивости живых

организмов.

Генетический код - совокупность кодонов (триплетов), кодирующих аминокислоты.

Генетический полиморфизм - долговременное существование в популяциях двух и более генотипов с частотой (1% и более), превышающих вероятность возникновения повторяющихся мутаций.

Ген-модификатор. Ген, который при взаимодействии с другими генами изменяет их фенотипическое проявление.

Генная инженерия - раздел биотехнологии, связанный с целенаправленным конструированием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке и синтезировать определенный продукт.

Генные (точковые) мутации - изменения в структуре ДНК.

Геном - 1. Полный гаплоидный набор генов или хромосом клетки или организма. 2. Весь генетический материал клетки, организма.

Геномика – раздел молекулярной генетики, изучающий геном, индивидуальные гены на молекулярном уровне, структуру (сиквенс) гена, его экспрессию и механизм редукции активности, клонирование генов и использование их в генно-инженерных целях

Геномные мутации – мутации, обуславливающие изменения числа хромосом в кариотипе.

Генотип - Вся генетическая информация, содержащаяся в организме; генетическая организация особи в одном или нескольких рассматриваемых локусах (ср. *Фенотип*); совокупность генов организма.

Генофонд - совокупность аллелей (генов) одной популяции (породы и т.д.), характеризующихся определенной частотой.

Гены-модификаторы - гены, не проявляющие собственного действия, но усиливающие или ослабляющие эффект действия других генов.

Гетерозигота - диплоидный организм, в гомологичных хромосомах которого находятся две разные аллели данного гена (*Aa*).

Гетерозиготность. Доля особей, гетерозиготных по данному локусу, или доля гетерозиготных локусов в генотипе особи.

Гетерозис - гибридная мощь, превосходство гибридов в отношении какого-то одного или по ряду признаков над обеими родительскими формами; синонимы: *гибридная сила* и *гибридная мощь*.

Гетерохроматин - генетически неактивные участки хромосом постоянно находятся в конденсированном состоянии.

Гибридизация - процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих гибрид РНК – ДНК.

Гибридома - клеточный гибрид, получаемый слиянием нормального лимфоцита, продуцирующего антитела, и опухолевой клетки; обладает способностью синтезировать моноклональные антитела.

.

Гистоны - белки, образующие в комплексе с ДНК нуклеосомы – структурные единицы хроматина в ядрах эукариот.

Гликопротеиды - сложные белки, содержащие углеводные компоненты.

Гомозигота - Клетка (или организм), содержащая в данном локусе гомологичных хромосом одинаковые аллели. (*AA, aa*).

Гомологи - хромосомы, имеющие одинаковые генетические локусы; диплоидная клетка обладает двумя копиями каждого гомолога, по одной от каждого родителя.

Гомозиготность. Доля особей, гомозиготных по данному локусу, или доля гомозиготных локусов в генотипе особи.

Гомологичные хромосомы. Хромосомы или участки идентичные в отношении последовательности локусов и видимой структуры; в процессе эволюции возникают также гомологичные гены и различные структуры, сходные между собой в силу их происхождения от общего предка.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Полинуклеотид, содержащий в качестве углеводного остатка дезоксирибозу; представляет собой основной генетический материал всех клеток.

Делеция – хромосомная мутация, в результате которой определенная последовательность нуклеотидов утрачивается (ср. *Дупликация*).

Денатурация ДНК или РНК - переход этих молекул из двухцепочной формы в одноцепочную; разделение цепей наиболее часто достигается нагреванием.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – биологическая макромолекула, носитель и хранитель генетической информации. См. *Дезоксирибонуклеиновая кислота*.

Домен в молекуле белка - участок аминокислотной последовательности, связанной с определенной функцией.

Доминирование - проявление действия лишь одного из аллелей у гетерозиготного организма.

Зигота - оплодотворенная яйцеклетка; образуется в результате слияния двух гамет. Диплоидная клетка.

Зоопланктон — см. *Планктон*.

Идентичные по происхождению гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности в силу того, что оба происходят от общего предка.

Идентичные по структуре гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности независимо от того, происходят они от общего предка или нет.

Инбредная депрессия - явление снижения жизнеспособности и продуктивности, ухудшение воспроизводительной функции в результате инбридинга.

Инбридинг - спаривание (подбор) близкородственных особей.

Инверсия – аберрация, при которой происходит отрыв участка хромосомы, поворот его на 180^0 и присоединение на прежнее место.

Индукцированные мутации - возникают под действием мутагенного фактора.

Интерфаза - фаза клеточного цикла между митотическими делениями клетки; подразделяется на G1, и S, G2.

Интроны - последовательности внутри структурного гена, которые не участвуют в кодировании белкового продукта гена. После транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам, удаляются из мРНК в процессе сплайсинга.

Кариотип - набор хромосом соматической клетки организма,

характерный для вида по числу, форме и величине.

Карта хромосом - план расположения генов в хромосоме

Клеточная инженерия - метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

кДНК - одноцепочная ДНК, синтезированная обратной транскриптазой на матрице РНК.

Клон - совокупность клеток или особей, произошедших от общего предка путем бесполого размножения.

Кодирующая цепь - та цепь ДНК, последовательность которой идентична мРНК.

Кодон - Группа из трех смежных нуклеотидов в молекуле мРНК, либо кодирующая определенную аминокислоту, либо обозначающая конец синтеза полипептидной цепи.

Комплементарная цепь - одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и комплементарная ей.

Кроссинговер - Обмен между гомологичными хроматидами, происходящий в процессе мейоза и лежащий в основе генетической рекомбинации.; если хроматиды имели разные наборы аллелей, то кроссинговер может быть выявлен по образованию генетически рекомбинантных хроматид.

Леталь. Ген (или хромосомная мутация), вызывающий гибель организма до достижения им половозрелости; если леталь доминантна, то погибают все ее носители, если же она рецессивна, то погибают только гомозиготы.

Летальные гены - гены, вызывающие гибель организма в 100% случаев.

Летальные мутации – мутации, несовместимые с жизнью.

Лигаза - фермент, способный устранять разрывы в молекуле ДНК, восстанавливая ковалентные связи между 5¹ - и 3¹ – концами молекул.

Лимфоциты-В - вид лейкоцитов, которые синтезируют и секретируют иммуноглобулины.

Лимфоциты –Т - вид лейкоцитов, которые выполняют различные функции в ходе иммунного ответа.

Локус - место в хромосоме, в котором картируется ген, отвечающий за определенный признак; локус может быть представлен любым аллелем данного гена.

Маркер (генетический) - любой аллель, используемый в эксперименте.

Мейоз - два последовательных деления клетки (I и II мейотические деления), в результате которых образуется исходное гаплоидное число хромосом в

каждой из четырех образовавшихся клеток. Эти клетки созревают и превращаются в гаметы (сперматозоиды и яйцеклетки).

Менделевская популяция. Группа скрещивающихся между собой организмов, образующая единый генофонд.

Метафаза – стадия митоза и мейоза, при которой хромосомы выстраиваются на экваторе клетки, образуя метафазную пластинку.

Мини-сателлитные последовательности (повторы) – простые тандемно повторяющиеся нуклеотидные последовательности генома эукариот с длиной повторяющейся части от 1 до 7 нуклеотидов.

Микросателлиты – присутствующие в эухроматине короткие тандемно повторяющиеся последовательности ДНК

Митоз - деление эукариотической соматической клетки.

Митохондриальные ДНК - небольшие кольцевые молекулы ДНК, присутствующие в митохондриях; кодируют некоторые компоненты митохондрий.

Мозаицизм - присутствие в организме клеток (точнее клонов) разного генотипа.

Молчащие мутации - не изменяют продукта, кодируемого геном.

Моногибридное скрещивание - скрещивание, при котором у родителей учитывается один признак, контролируемый одним локусом.

Мутагенез – процесс возникновения мутаций.

Мутагены - факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций, вызывая изменения в ДНК.

Мутация – скачкообразное, стойкое изменение в структуре ДНК и кариотипе.

Наследственные болезни - болезни, вызываемые мутацией генов одного или нескольких локусов и сопровождающиеся появлением аномалий, уродств и т.д.

Нехватка - утрата концевых участков хромосом.

Нуклеоид - ядерная зона в прокариотической клетке; она содержит хромосому, но не окружена мембраной. Компактное образование у бактерии, содержащее ДНК.

Нуклеосома - основная структурная единица хроматина, состоящая из ~ 200 нуклеотидных пар ДНК и октомера гистоновых белков.

Обратная транскриптаза - РНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, осуществляющий синтез ДНК на матрице РНК.

Однонуклеотидные замены (полиморфизмы) – генные мутации, затрагивающие один нуклеотид.

Плазида - кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

Полипептид. Последовательность аминокислот, связанных между собой ковалентными пептидными связями; белок.

Половые хромосомы. Хромосомы, участвующие в определении пола и различающиеся у представителей разных полов (ср. *Аутосомы*).

Промотор - участок ДНК, ответственный за связывание РНКполимеразы, инициирующей транскрипцию.

Процессинг - совокупность реакций, ведущих к превращению первичных продуктов транскрипции и трансляции в функционирующие молекулы.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – амплификация ДНК в условиях *in vitro* (в пробирке).

Рекомбинантная ДНК - искусственно полученная молекула ДНК.

Рекомбинация. Образование новых сочетаний отдельных участков молекул ДНК (хромосом).

Репарация – восстановление повреждённой структуры ДНК.

Репрессор - ген, подавляющий действие другого гена.

Репликон – часть молекулы ДНК, в которой осуществляется синтез новой ДНК в одноцепочечной форме.

Репликация - процесс самовоспроизведения нуклеиновых кислот, обеспечивающий точное воспроизведение генетической информации.

Рестрикция - процесс разрезания молекулы ДНК ферментами – рестриктивными эндонуклеазами.

Рецепторы - макромолекулярные структуры клеточной поверхности, с помощью которых клетки узнают антигены.

Рецессивность - отсутствие проявления одного из аллелей в гетерозиготе.

Рецессивный аллель. Аллель (или соответствующий признак), проявляющийся лишь в гомозиготном состоянии.

Рецессивный ген - ген, влияющий на развитие признака только в гомозиготном состоянии.

Рибонуклеиновая кислота (РНК). Полинуклеотид, содержащий в отличие от ДНК урацил вместо тимина и сахар рибозу вместо дезоксирибозы

Рибосома - органоид цитоплазмы, с участием которого происходит синтез белка в клетке.

мРНК – матричная, информационная РНК (иРНК), кодирующая белки.

РНК – одноцепочечные полимерные молекулы нуклеиновых кислот, участвующие в процессах биосинтеза белка и выполняющие разные функции (мРНК, тРНК, рРНК).

Сайт – место, занятое точковой мутацией внутри цистрона, т.е. любая пара нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК

Системы групп крови - совокупность антигенов, контролируемых одним локусом.

Сплайсинг - процесс удаления интронов и объединения экзонов в мРНК.

Структурный ген - кодирует РНК или белок.

Тератология - наука, изучающая уродства.

Терминатор - последовательность ДНК, находящаяся на конце транскрипта и ответственная за прекращение транскрипции.

Терминирующий кодон - один из трех триплетов УАГ, УАА или УГА, вызывающих терминацию синтеза белка; их также называют бессмысленными кодонами.

Точковые мутации - изменение одной пары оснований.

Трансгенез - экспериментальный перенос генов, выделенных из определенного генома или искусственно синтезированных, в другой геном.

Трансдукция - перенос генов из одной бактериальной клетки в другую при помощи бактериофага.

Транскрипция - процесс синтеза РНК на ДНК-матрице.

Транслокация - перемещение гена или участка хромосомы из одного локуса в другой.

Трансляция - процесс синтеза белка на матричной мРНК.

Трансплантация эмбрионов - метод ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных (доноров) путем получения и пересадки эмбрионов менее ценным животным (реципиентам).

Трансформация бактериальных клеток - приобретение нового генетического маркера в результате включения экзогенной ДНК.

Трансформация эукариотических клеток - переход в состояние неконтролируемого роста; имеет много общего или совпадает с опухолевым перерождением клеток.

Триплет - набор трех нуклеотидов (синоним кодона).

Трисомия — наличие добавочной хромосомы в кариотипе диплоидного организма.

Фаг (бактериофаг) - бактериальный вирус.

Фрагменты Оказаки - короткие фрагменты ДНК длиной несколько тысяч (бактерии) или несколько сотен (эукариоты) нуклеотидов образуется в результате прерывистой репликации; впоследствии ковалентно соединяются в непрерывную цепь.

Химеры - растения или животные со смешанными тканями двух организмов.

Хроматиды - хромосомные копии, образующиеся при репликации.

Хромосомы - Нитевидная структура в ядре клетки, содержащая гены, расположенные в линейной последовательности; молекула ДНК,

представляющая весь геном прокариотических клеток; молекула ДНК в комплексе с гистонами и другими белками в эукариотических клетках.

Экзон - любой отдельный фрагмент прерывистого гена, который сохраняется в зрелой РНК.

Экзонуклеазы - ферменты, последовательно отщепляющие нуклеотиды с концов полинуклеотидной цепи; могут быть специфичными в отношении 5' – или 3' – концов ДНК или РНК.

Экспрессивность - влияние данного аллеля на степень выраженности признака.

Экспрессия гена – активизация транскрипции гена, в процессе которой на ДНК образуется мРНК.

Электрофорез фрагментов ДНК – процесс, обеспечивающий разделение фрагментов ДНК на поверхности геля. Фрагменты движутся в геле, помещённом в постоянное электрическое поле, от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется).

Электрофорез. Метод разделения молекул, основанный на их разной подвижности в электрическом поле.

Эндонуклеазы - ферменты, расщепляющие связи полинуклеотидной цепи нуклеиновых кислот; могут быть специфичны в отношении РНК одноцепочных или двухцепочных ДНК.

Энзимы – ферменты, вещества белковой природы, участвующие в биохимических реакциях.

Эписома - плаزمид, способная интегрироваться в бактериальную ДНК.

Эухроматин - представляет собой весь генетический материал интерфазного ядра, за исключением гетерохроматина.

Ядро – жизненно важный органоид клеток эукариот, содержащий ДНК.

Ядрышко - обособленная область ядра, образуемая при транскрипции генов рРНК.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Структура и трудоёмкость дисциплины (модуля).....	4
Объём дисциплины.....	4
Содержание дисциплины (модуля).....	7
Раздел 1. Молекулярно-генетические методы диагностики.....	5
Раздел 2. Видовая идентификация.....	15
Раздел 3. Обеспечение безопасности пищевой продукции из ГМИ.....	23
Раздел 4. Молекулярно-генетический мониторинг производственных процессов.....	31
Темы контрольных работ.....	76
Список основной литературы.....	79
Список дополнительной литературы.....	79
Перечень информационных ресурсов.....	79
Глоссарий,	81
Содержание.....	93

Составитель
Себежко Ольга Игоревна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В
ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

Методические указания по выполнению самостоятельной и контрольной
работ

Формат 60×84 1/16 2,4 усл.печ.л.

В авторской редакции

Компьютерная вёрстка О.И. Себежко