

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АТЛАНТИЧЕСКОЙ ТРЕСКИ (*GADUS MORHUA*) МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

ATLANTIC COD (*GADUS MORHUA*) DIFFERENTIATION USING REAL-TIME PCR

**T. Fomina
N. Oyun
K. Kurbakov
M. Minaev**

Summary. Atlantic cod (*Gadus morhua*) is one of the most important fishing species. Food producers often falsely indicate the presence of Atlantic cod in processed fish products, while in fact replacing it with the cheaper fish species. One of the effective ways to address this problem may be genetic identification of Atlantic cod in fish products. The authors suggest a technique for Atlantic cod identification on the basis of the mitochondrial *COI* gene using real-time PCR. The system accurately identifies the Atlantic cod DNA fragment both in fresh fish samples and in samples subjected to heat treatment, and therefore may be used in control studies in specialized laboratories to confirm the food product composition.

Keywords: Atlantic cod, differentiation, *COI* gene, fish products.

Фомина Татьяна Алексеевна

К.т.н., с.н.с., Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН (Москва)
fomina1032@yandex.ru

Оюн Надежда Юрьевна

К.б.н., с.н.с., Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН
nad_oyun@mail.ru

Курбаков Константин Андреевич

Старший инженер, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН
homo_ludens@vniimp.ru

Минаев Михаил Юрьевич

К.т.н., доцент, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН
mminaev@inbox.ru

Аннотация. Атлантическая треска (*Gadus morhua*) является одним из наиболее важных промысловых видов. Производители зачастую указывают недостоверную информацию о наличии атлантической трески в переработанных рыбных продуктах, а также осуществляют подмену филе более дешевыми сортами рыбы. Одним из эффективных путей решения данной проблемы может стать генетическая идентификация атлантической трески в рыбных продуктах. Авторы предлагают метод идентификации атлантической трески на основе митохондриального гена *COI* с применением ПЦР в реальном времени. Система безошибочно идентифицирует фрагмент ДНК атлантической трески как в образцах свежей рыбы, так и в пробах, подвергшихся термической обработке, в связи с чем может применяться в контрольных исследованиях в профильных лабораториях с целью подтверждения соответствия состава продукта.

Ключевые слова: атлантическая треска, идентификация, ген *COI*, рыбная продукция.

Атлантическая треска (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) — хищная морская бентопелагическая рыба из семейства тресковых (Gadidae), является одной из наиболее важных промысловых рыб Северной Атлантики [1, 2]. По количеству полезных микроэлементов треска не уступает красной рыбе, при этом относится к разряду диетических. По данным Федерального агентства по рыболовству, в 2018 году квота на вылов трески в России составила 511,9 тыс. тонн, на минтай — 1775,9 тыс. тонн [3]. Необходимо отметить, что производителями зачастую происходит подмена атлантической трески более дешевой тихоокеанской треской (*G. macrocephalus*), либо минтаем (*Theragra chalcogramma*), поскольку они не имеют явных морфологических отличий. В связи с этим необходимой и своевременной является разработка молекулярно-генети-

ческих методов видовой идентификации атлантической трески для исключения из торговли недоброкачественной и фальсифицированной продукции. Поскольку дивергенция по митохондриальному гену *COI* (цитохром оксидазы I) атлантической трески с другими видами близкородственных рыб составляет не менее 3%, является возможным создание ДНК-диагностикума для *G. morhua*. Целью исследования является разработка методики видовой идентификации атлантической трески (*G. morhua*) методом ПЦР в реальном времени на основе полиморфизма гена *COI* мтДНК.

Материалы и методы

Работа выполнена в 2019 г. на базе и при финансовой поддержке Федерального государственного бюджет-

ного учреждения «Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры».

Для выявления уникальных участков в гене *COI* мтДНК *G. morhua* из базы GenBank NCBI заимствовано 169 последовательностей гена *COI* атлантической трески. Выравнивание последовательностей проводили в MAFFT v.7.205 [4]. Дизайн праймеров осуществляли в программе Primer-BLAST [5] и OligoAnalyzer 3.1 [6]. Праймеры и зонд выбраны с учетом требований, предъявляемых к праймерам и зондам [7, 8].

В результате наиболее оптимальным для дизайна праймеров и зонда был выбран участок гена *COI* митохондриальной ДНК *G. morhua* в позициях 872–1132 референсной последовательности GenBank NCBI: LS999407.1. Длина амплифицируемого нами фрагмента составляет 261 п.н., включая праймеры: Gmor_F (acatgtttacagtcggaatggac), Gmor_R (ggaaatgggctactacgtaatac) и Gmor_Probe (FAM-gggctcaattaaatgagagacaccscta-BHQ1).

При изучении теоретической специфичности подобранных праймеров и зонда, была установлена их гомология в отношении к соответствующим участкам гена *COI* морфологически схожих видов (*Gadus macrocephalus*, *Pollachius virens*, *Theragra chalcogramma*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Merlangius merlangus*). В ходе практических исследований было установлено, что предложенный метод идентифицирует исключительно целевую ДНК атлантической трески (*G. morhua*) и не выявляет ДНК близкородственного *Gadus macrocephalus*, а также морфологически схожих видов.

В рамках эксперимента в качестве положительного контроля использовали 12 проб из стандартных образцов атлантической трески (*G. morhua*). Все стандарты (положительные и отрицательные контроли) и опытные образцы были предоставлены испытательной референс-лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры» Россельхознадзора, ФГБУ «НЦБРП». Стандарты представляли собой навески фарша, полученного из сырой мороженой рыбы. В качестве отрицательного контроля использовали стандарты 20 видов рыб, наиболее встречающихся в торговой сети: 2 образца трески тихоокеанской (*G. macrocephalus*), 5 — пикши (*Melanogrammus aeglefinus*), 2 — минтая (*Theragra chalcogramma*), 5 — сайды (*Pollachius virens*), 3 — путассу (*Micromesistius poutassou*), 1 — судака (*Sander lucioperca*), 1 — сома (*Silurus glanis*), 1 — сазана (*Cyprinus carpio*), 2 — скумбрии (*Scomber scombrus*), 3 — окуня (*Perca fluviatilis*), 1 — карася (*Carassius carassius*), 1 — карпа (*Cyprinus*

carpio), 1 — зубатки пёстрой (*Anarhichas denticulatus*), 1 — зубатки синей (*Anarhichas denticulatus*), 8 — лосось атлантического (*Salmo salar*), 2 — радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), 3 — нерки (*Oncorhynchus nerka*), 1 — кижуча (*Oncorhynchus kisutch*), 1 — горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*), 1 — кеты (*Oncorhynchus keta*). Общее количество проб отрицательных контролей составило 45.

Для определения аналитической чувствительности использовали опытные образцы *G. morhua* в виде фарша (сурими) с содержанием атлантической трески 0,1%, 0,01% и 0,001%. Так же использовались образцы с содержанием *G. morhua* 5%, 1% и 0,1%, подвергшиеся автоклавированию при температуре согласно технологическим режимам консервирования — в течение 30 мин при 120°C (Табл. 1).

С использованием разработанных праймеров был проведён анализ 246 образцов пищевой продукции, в составе которой производителем заявлено наличие атлантической трески, на предмет соответствия. Для исследования взяты 196 образцов филе трески, 29 — полуфабрикатов (котлеты, наггетсы, пельмени), 10 — консервированной икры трески и 11 — консервированной печени трески (Табл. 2).

Выделение ДНК осуществляли из 50 мг образца. Экстракция проводилась с использованием набора MagNa Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue) на станции MagNA Pure LC2.0 в соответствии с инструкцией производителя (Roche, Germany).

Амплификацию исследуемого фрагмента проводили методом Real-Time PCR на амплификаторе qTower 2.2 (Analytik Jena, Germany) с использованием набора «M-428 2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, Россия). Объём реакции 30 мкл, включает 10 мкл 2,5x реакционной смеси (2,5x ПЦР-буфер Б, SynTaq ДНК-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20), 16 мкл H₂O, 2 мкл ДНК, 2 мкл смеси праймеров. Конечная концентрация фланкирующих праймеров 0,2 мкмоль, зонда — 0,1 мкмоль. Условия реакции: первичная денатурация: 95°C — 90 с; 45 циклов: 95°C — 10 с, 61°C — 20 с, 72°C — 20 с. Реакция для каждого образца проводилась с трёхкратной повторностью.

Результаты и обсуждение

При экспериментальном подтверждении специфичности разработанных праймеров все стандартные образцы *G. morhua* (положительный контроль) показали положительный результат. При этом близкородственный *G. macrocephalus* и наиболее встречающиеся в торговой сети виды рыб — отрицательный.

Таблица 1. Установление предела обнаружения (LOD) ПЦР с разработанными праймерами

Содержание целевой матрицы (<i>Gadus morhua</i>),%	Cq средняя по FAM qTower2.2
Сырой фарш	
0.1	31,89±0.2
0.01	34,34±0.3
0.001	37,86±0.5
Автоклавированный фарш	
5	38,15±0.5
1	-
0.1	-

Таблица 2. Результаты идентификации атлантической трески (*G. morhua*) в исследуемых образцах

Код (шифр)	Содержание <i>G. morhua</i> (%)	Вид обработки пробы	Общее кол-во проб	Кол-во положительных проб	% соответствия
Контроль «+»	100	Фарш сырой	12	12	100
Контроль «-»	0	Фарш сырой	45	-	-
Филе трески	неизвестно	Сырая	196	69	35,2
Полуфабрикаты	неизвестно	Котлеты рыбные, наггетсы,пельмени	29	23	79,3
Икра трески	неизвестно	Консервы	10	7	70
Печень трески	неизвестно	Консервы	11	11	100

При определении предела обнаружения LOD (limit of detection) метода было установлено, что система позволяет выявлять целевую ДНК трески, выделенную из 50 мг сырой рыбы с содержанием трески до 0,001%. Однако при исследовании термически обработанных образцов LOD составил не менее 5%. Испытания проводились с трехкратной повторностью. Значения пороговых циклов (Cq) данных реакций представлены в таблице 1.

В результате исследования 246 образцов продуктов питания, в составе которых заявлено наличие атлантической трески, ДНК *G. morhua* обнаружена лишь в 110 из них, что составляет 44,7% (табл. 2). Соответствие заявленному составу подтвердилось в 79,3% проб полуфабрикатов и в 70% проб икры. Отметим, что чаще всего фальсификация видового состава обнаруживалась при

анализе филе трески (64,8%). Принадлежность к виду *G. morhua* была установлена для всех образцов консервированной печени. Из результатов видно, процент фальсификаций достаточно велик, что делает необходимым и целесообразным применение ДНК-диагностики для определения видовой принадлежности рыб и подтверждения соответствия состава продукта.

Выводы

Таким образом, разработанная система праймеров и предлагаемая методика диагностики являются пригодными для идентификации трески атлантической (*G. morhua*) как в биологических образцах, так и в рыбных продуктах, подвергшихся кулинарной обработке. Данный метод обладает необходимой чувствительностью и не дает ложноположительных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тетерина А.А., Животовский Л.А. ДНК-маркеры для идентификации стационарного и мигрирующего экотипов атлантической трески *Gadus morhua* // Генетика. 2017. Т. 53. № 7. С. 872–876.
2. Бойцов В.Д., Лебедь Н.И., Пономаренко В.П. и др. Треска Баренцева моря: биология и промысел // Мурманск. 2003. 296 с.
3. Информация об освоении квот на добычу (вылов) водных биологических ресурсов российскими пользователями в отчетном году в сравнении с предыдущим годом по состоянию на 26.12.2018 года // Федеральное агентство по рыболовству. 2018.
4. Katoh K., Kuma H., Toh H., Mitaya T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 2. P. 511–518.
5. Primer-BLAST, National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine. USA. 2017. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>
6. OligoAnalyzer 3.1. Integrated DNA Technologies. Inc. Coralville. IA. USA. 2017. URL: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
7. Quellhorst G., Rulli S. A Systematic Guideline for Developing the Best Real-Time PCR Primers // SABiosciences Corporation. URL: www.SABiosciences.com
8. Raymaekers M. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays // Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2009. V. 23. P. 145–151.

© Фомина Татьяна Алексеевна (fomina1032@yandex.ru), Оюн Надежда Юрьевна (nad_oyun@mail.ru), Курбаков Константин Андреевич (homo_judens@vniimp.ru), Минаев Михаил Юрьевич (mminaev@inbox.ru).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова