

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

Жангирбаева Ж.Д.

Ет өнімдерінің шикізат құрамын идентификациялау (халал)

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 – «Биотехнология» мамандығы

Алматы 2020

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ

ХжБИ кафедрасы меңгерушісі

Елигбаева Г.Ж.

« » 2020 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Ет өнімдерінің шикізат құрамын идентификациялау (халал)»

5B070100 – «Биотехнология» мамандығы бойынша

Орындаған

Жангирбаева Ж.Д.

Ғылыми жетекші

Б.ғ.д. қауымдастырылған профессор

Г.В. Курбанова

« » 2020 ж.

Алматы 2020

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

5B070100 – «Биотехнология»

БЕКІТЕМІН

ХжБИ кафедрасы меңгерушісі

_____ Елигбаева Г.Ж.

« ____ » _____ 2020 ж.

**ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС ОРЫНДАУҒА
ТАПСЫРМА**

Білім алушы Жангирбаева Жанат Дузелбаевна

Тақырыбы Et өнімдерінің шикізат құрамын идентификациялау (халал)

Университет басшысынан

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі «10» 05. 2020 ж.

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі

а) Et өнімдерінің шикізат құрамының халалдығын анықтау;

ә) Real-Time ПТР әдістемесімен танысу;

б) ПТР көмегімен алынған үлгілердің Халал сапасын зерттеу, тексеру;

Ұсынылатын негізгі әдебиет: 28 атау

Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастыралатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Әдебиетке аналитикалық шолу	қаңтар	
Материалдар мен әдістер	ақпан	
Зерттеу қортындылары: лабораториялық жұмыстар	наурыз	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен
норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған
қолтаңбалары

Бөлімдер атауы	Кеңесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Норма бақылау	Ғылыми магистрі Курбанова Г.В		

Ғылыми жетекші _____ Г.В. Курбанова

Тапсырманы орындауға алған білім алушы _____ Ж.Д. Жангирбаева

Күні « ____ » _____ 2020 ж.

АҢДАТПА

Ж.Д. Жангирбаеваның «Ет өнімдерінің шикізат құрамын идентификациялау («Халал») тақырыбындағы дипломдық жұмысы 31 беттен және кіріспеден, әдебиеттерді шолудан, зерттеу материалдары мен әдістерінен, жеке зерттеу нәтижелерінен, қорытындыдан, пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады.

Дипломдық жұмыстың мақсаты ет өнімдері шикізатының жағдайын анықтау, идентификациялау болып табылады. Шошқа етінің антигенін және ПТР – талдау әдісін нақты уақыт режимінде сапалы анықтау үшін иммунохроматографиялық тестті пайдала отырып, ет шикізаты мен ет өнімдеріне шошқа етінің бар – жоғына зерттеу жүргізу.

Зерттеу нәтижесінде «Халал» таңбалауына сәйкес келмейтін ет өнімдерін фальсификациялау фактілерін анықтады. Зерттелген 10 үлгінің 6-нан шошқа ДНҚ табылды.

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа Жангирбаевой Ж.Д. на тему: «Идентификация сырьевого состава мясной продукции («Халал») изложена 31 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, выводов, списка использованных источников литературы.

Целью дипломной работы является определение, идентификация состояния сырья мясных продуктов. Проведены исследования мясного сырья и мясных продуктов на наличие свинины с использованием иммунохроматографического теста для качественного выявления антигена свинины и метода ПЦР – анализа в режиме реального времени.

Анализ результатов эксперимента установил факты фальсификации мясных продуктов, не соответствующих маркировке «Халал». Из 10 исследованных образцов в 6 из них была обнаружена ДНК свинины.

ANNOTATION

Diploma Zhangirbaeva Zh.D. on the subject: “Identification of raw composition of meat products (“Halal”) contained 31 pages and consists of introduction, literature review, materials and methods of research, the results of our research, conclusions list of references.

The purpose of the diploma is to determine and interpret the state of raw meat products. Research of raw meat and meat products for the presence of pork using an immunochromatographic test for qualitative detection of pork antigen and real – time PCR analysis.

Analysis of the results of the experiment established the facts of falsification of meat products that do not correspond to the “Halal label”. Of the 10 samples examined, 6 of them were found to contain pork DNA.

МАЗМҰНЫ

КІРІСПЕ	9
1 Әдебиетке шолу	10
1.1 Ет және ет өнімдері ҚР Техникалық регламенті реттеу объектісі ретінде	10
1.2 Ет және ет өнімдерін фальсификациялау	11
1.3 Ет өнімінің құрамын идентификациялау	15
2 Зерттеу жұмыстары	16
2.1 Зерттеу материалдары мен әдістері	16
2.1 Қолданылатын реагенттер мен құрылғылар	16
2.3 ДНҚ экстракциясы	18
2.3 Амплификация реакциясы	19
3 Зерттеу нәтижелері	21
3.1 Primer Express 2 бағдарламасымен праймерлерді құрастыру	21
3.2 Амплификацияның оңтайлы шарттарын таңдау	21
3.3 ПТР әдісін нақты уақытта қолданудың шектеуші факторларын анықтау	26
ҚОРЫТЫНДЫ	
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	

КІРІСПЕ

Өнімді сәйкестендіру құрамы, функционалдық қасиеттері, азық – түлік құндылығының белгілі бір мақсатта өзгеруін анықтауға арналған. Ет пен ет өнімдерін (халал) сәйкестендірудің маңыздылығы тамақ өнімдерінің қауіпсіздігін қамтамасыз ету болып табылады. Техникалық регламент талаптарын орындау және мемлекеттік бақылау мен қадағалау Қазақстан Республикасының 2007 жылғы 21 шілдедегі № 301-III «Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігі туралы» заңдары, Кеден Одағының 2011 жылғы желтоқсандағы № 880 «Тамақ өнімдерінің техникалық қауіпсіздігі туралы» заңдары бойынша қарастырылады. Қолданылатын шикізаттың табиғи дәрежесін және функционалдық қасиеттерін және де дайын өнімнің тағамдық құндылығын анықтау үшін сәйкестендірудің арнайы әдістері қолданылады. Бұл жолда ДНҚ диагностика әдістері, атап айтқанда Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісі ең сенімді болып саналады.

Қазіргі қоғамда халал өнімдерін пайдалану сау тамақтануға аса артықшылықпен қарайтын, спортпен айналысуға тырысатын және өз денсаулығына немқұрайлы қарамайтын, фастфудтан бас тартатын адамдардың назарын көбірек тартады. Өйткені бұл өнімдер оны өндіру тәсілдері мен оның сапасына қойылатын айрықша талаптарымен ерекшеленеді.

Жұмыстың мақсаты: ет өнімдерінің шикізат құрамының халалдығын анықтау, сәйкестендіру

Жұмыстың міндеті:

- 1) Зерттеулер жүргізілген ұқсас еңбектермен, әдебиеттермен танысу;
- 2) Зерттеу нысаны ретінде Алматы қаласы «Сабыржан» супермаркетінен материалдар жинау. Аспап ПЦР әдістемесімен танысу, олармен жұмыс істеу әдістемесін жаттау;
- 3) ПЦР көмегімен алынған ет өнімдерінің Халал сапасын зерттеу, тексеру.

1 Әдебиетке шолу

1.1 Ет және ет өнімдері ҚР Техникалық регламенті реттеу объектісі ретінде

Қазақстан Республикасының Техникалық регламент жүйесі бойынша ет және ет өнімдері, азық - түлік шикізаты мен тамақ өнімдерінің қауіпсіздігін мемлекеттік реттеу мынадай жолмен жүзеге асырылады:

- Тамақ өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігінің сәйкестігін бағалау және растау әдістеріне, бақылау (талдау) әдістеріне, азық- түлік өнімдеріне қойылатын талаптар уәкілетті мемлекеттік органдар бекіткен нормативтік құжаттарда белгіленеді;

- Тағамдық және биологиялық активті қоспалардың, тамақ өнімдерінің тағамдық және энергетикалық құндылығына, сондай-ақ тамақ өнімдерін дайындау, тасымалдау, өткізу (сату) және қоғамдық тамақтандыру қызметтерін көрсету жағдайларына қойылатын талаптар мемлекеттік (мемлекетаралық) Стандарттар және санитарлық ережелер нормаларымен белгіленеді;

- Жануардың азық – түлік шикізатын дайында, сақтау, тасымалдау, қайта өңдеу және өткізу кезіндегі сапасы мен қауіпсіздігіне қойылатын талаптар мемлекеттік (мемлекетаралық) Стандарттармен және ветеринарлық – санитарлық ережелермен белгіленеді [1].

2014 жылдың 1 мамырынан бастап ет және ет өнімдеріне Кеден одағының техникалық регламенті күшіне енді [2].

“Halal” өнімінің ерекшелігі химиялық қоспаларды аз пайдалануы, экологиялық таза шикізаттан жасалуы. “Halal journal” малайзиялық басылымдарының мәліметі бойынша, Дүниежүзілік азық - түлік нарығының 16 %-ын “халал” өнім құрайды. Қазіргі таңда отандық дүкен сөрелерінде халал өнімдерінің түрлері көбейіп кетті. “Халал” маркасымен заңсыз таңбалауда жиілеп тұр. Бұл мәселені шешуде Қазақстан Республикасы “халал” өнімдерін шығаратын мемлекеттік стандарт 2006 жылы енгізілді. Қазақстанда Halal Food MS 1500-2004 стандарты бойынша жұмыс істейтін 500-ге жуық өндіруші тіркелген [3-4].

Қазақстан Халал индустриясының қауымдастығы: «Халал» стандарттау, сертификаттау және аккредиттеу жөніндегі халықаралық орган, Қазақстан аумағында құрылған сертификаттау жөніндегі бірінші орган. ЖАКІМ жүйесіндегі Қазақстан Халал индустриясының қауымдастығы (АХИК) 2017 жылдың ақпан айынан бастап ТМД-дағы жалғыз аккредитацияланған орган болды. Малайзияның ең беделді органы ЖАКІМ -нан Халал орган ретінде сертификаттау тағайындалды. Енді біздің ұйымның Халал логотипі әлемде де мойындалады. Қазақстанның “Халал” ҚХИҚ -тен алынған сертификат қазақстандық өндірушілерге өнімдерді мұсылман әлемі елдеріне экспорттауға мүмкіндік береді. Қазақстандағы Халал индустриясының негізін қалаушы Сарсенбаев Марат Агибайұлы [5].

Стандарттау, метрология және сертификаттау жөніндегі Еуразиялық кеңес. “Халал” өнімі өндіру (дайындау) процестеріне, оның ішінде орауға, таңбалауға, сақтауға, тасымалдауға, өткізуге қойылатын нормативтік құжаттардың талаптарына сәйкес болуы тиіс [6]. Соның ішінде кейбіреулеріне тоқталып кетсек.

«Халал өнімдерін өндіру кезінде пайдаланылатын шикізатқа, компоненттерге (ингредиенттерге) қойылатын талаптар.

Халал өнімдерін дайындау кезінде тек халал шикізаты мен компоненттерін пайдалануға рұқсат етіледі. Тыйым салынған жануарлардың етін, сондай-ақ олардың бөліктері мен мүшелерін пайдалануға жол берілмейді. “Халал” өнімдерін өндіру үшін пайдаланылатын ингредиенттер шошқа етінен немесе оның туындыларынан өнімдер өндірілетін өндірістік орындарда дайындалмауы қажет. “Халал” өнімдерін өндіруде қолданылатын микроорганизмдер “Халал” өнімдерінен алынған қоректік ортаны қолдана отырып алынуы тиіс. Егер микроорганизмдер құрамында шошқа еті мен оның туындылары “Харам” және наджас өнімдері бар қоректік ортадан бөлу жолымен алынса, онда микробиологиялық компоненттер өндіріс процесінде тазартылуы қажет. Егер ол қайта өңдеу өнімі болып табылмаса, “Халал” өнімін өндіру кезінде этил спиртін пайдалануға жол беріледі. Этил спиртін халал тамақ өндіру кезінде, егер ол дайын өнімде спирт деңгейі 1 -дан аспайтын болса қолдануға болады [6].

Өндірістік орындарға, технологиялық жабдықтарға, ыдысқа қойылатын талаптар: “Халал” өнімдерін өндіру және сақтау үшін қолданылатын өндірістік орындар, технологиялық жабдықтар, инвентарь, ыдыс өнеркәсіптің тиісті салалары үшін заңнама талаптарына сәйкес болуы тиіс. Технологиялық жабдық, инвентарь, орама “Харам” өнімін дайындамауы немесе ұстамауы керек. Құстарды, жануарларды сою жүргізілетін орындар “Халал” өнімдерін әзірлеу процесін тұрақты бақылау үшін online бейне бақылау жүйесімен жабдықталуы қажет. Жануарларды, құстарды союды білікті маман жүзеге асыру қажет. Жұмыс басталар алдында технологиялық жабдық, ыдыс кәсіпорында санитарлық өңдеуден өтуі тиіс. Жуу және тазалау рәсімін жүргізу журналда өткізу күні, орындаушылардың аты - жөнін және халал бақылаушының қолы қойылып тіркеледі. Санитарлық- гигиеналық өңдеудің сапасы, іс-шаралардың орындалуы туралы құжаттаманы қағаз және электронды түрде сақталып, зертханалық-аспатық сынақтардың, тестілердің нәтижелерімен расталуы тиіс. Өнімді халал белгісімен таңбалауға өнімнің осы стандарт талаптарына сәйкестігін растайтын сәйкестік сертификаты болған кезде ғана рұқсат етіледі [6].

1.2 Ет және ет өнімдерін фальсификациялау

Ет және ет өнімдері ең құнды азық-түлік өнімдеріне және жиі бұрмаланатындар санатына жатады [7]. Бұл жағдайда фальсификация азық –

түлік тауарының қандай да бір тұтынушылық қасиеттерін нашарлатуға немесе неғұрлым тән көрсеткіштерін сақтай отырып, оның санын азайтуға бағытталған іс – әрекет ретінде қарастырылады. Фальсификация көбінесе өнімге тән ерекше белгілер беру болып табылады, мысалы, тағам құндылығының жекелеген маңызды қасиеттерінің жалпы нашарлауы немесе толық жоғалуы кезінде сыртқы түрі, түсі, консистенциясы (толыққанды ақуыздар, майлар, минералды заттар, витаминдер және т.б.) [8].

Фальсификацияның ең көп таралған тәсілі – бұл МЕМСТ сәйкес жасалған өнімдер ретінде жарияланған ет өнімдерінің рецепті, әр түрлі функционалды және технологиялық қоспалар, атап айтқанда сүт ақуызы, соя протеині, соя изоляттары, шошқа терісінен эмульсия, крахмал, каррагенан және оның тұздары және т.б. рұқсатсыз енгізу болып табылады [9-10].

2008-2011 жж. В.М. Горбатов атындағы Бүкілресейлік ғылыми – зерттеу институтының МЕМСТ сәйкес өндірілетін пісірілген шұжық өнімдеріне мониторинг жүргізу барысында алынған деректер осы жалған қабылдаудың жоғары пайызын растады. Зерттеулер ет өнімдерінің құрамын сәйкестендірудің гистологиялық әдісі арқылы жүргізілді. Нәтижелер ет комбинаттарының жалпы санының 20 % -дан астамы құрамында бір немесе бірнеше атауларының көп мөлшерде жол берілмейтін қоспалары бар өнім өндіретінін көрсетті. Кәсіпорындардың 30 % - ын дадайын емес мөлшерде екі түрлі рұқсат етілмеген көкөніс қоспалары бар пісірілген шұжық өнімдері шығарылады, ет өңдеу кәсіпорындарының 32 % -ы астамы қоспалар үшін бірдей атауды пайдаланады, ал кәсіпорындардың 15 % - ы рұқсат етілгеннен асатын қоспаларды мүлдем қолданбайды [11].

Соя протеинінің препараттарын қолдана отырып және оларды жарияламаған өндіруші екі есе жауапкершілік алады. Біріншіден, соя көбінесе трансгендік түрлендіруге ұшырайды. Азық – түлік өнімдеріндегі генетикалық түрлендірілген ингредиенттердің болуы өзекті мәселе болып табылады. Көптеген зерттеулер бойынша модификацияланған шикізат өзінің тұтынушылық қасиеттері бойынша дәстүрлі шикізаттан айырмашылығы аз, және де трансгендік өнімдердің қауіпсіздігі анық дәлелденбеген. Осыған байланысты трансгендік өнімдер туралы ақпарат тұтынушы үшін барынша ашық болуы тиіс және тек отандық өнімдер мен биотехнологиялық әдістерді қолдану арқылы алынған өнімдер арасында таңдау жасауы керек. Еуропалық Парламент пен Кеңестің (ЕО) 2003 жылғы 22 қыркүйектегі №1829/2003 және 1830/2003 құжаттамасына сәйкес құрамында ГМО құрамдастары 0,9% - дан аспауы қажет. РФ-да азық -түлік өнімдерінде ГМО бар болуы туралы белгі 2006 жылғы 24 қаңтардағы №0Ю0/446-06-32 «ГМО бар тамақ өнімдерін заттаңбалау туралы», «Тұтынушылардың құқықтарын қорғау туралы» түсіндіру хатымен реттеледі [12-13].

Мұнда ГМО – ның бар-жоғын анықтау және оның тамақ өнімдеріндегі құрамын сандық бағалау тек ПЦР-ға негізделген әдістермен ғана мүмкін екендігін атап өткен жөн [7].

Екіншіден, өнімдегі соя компоненттерін құжаттамалау, өндіруші соя ақуыздары аллергиялар болып табылатын тұтынушылар санатына үлкен зиян келтіруі мүмкін. Мұндай ақуыздардың тіпті шағын дозада ағзаға түсуі күшті аллергиялық реакция тудыруы мүмкін. Бұқаралық ақпарат құралдарының хабарламалары бойынша аллергиялық реакциялар балалардың 8 % - да және ересек адамдардың 2 %-да жиі кездеседі. Аллергия жағдайлары жиі қайталанатын жәнәсозылмалы түрге ие болады [12].

Осылайша, құрамында жол берілмейтін функциональдық – технологиялық қоспалар немесе рецептурада көрсетілмеген ингредиенттер немесе заттаңбада көрсетілмеген ингредиенттер бар азық – түлік өнімдерін сатып ала отырып, біз бірнеше бұрмалау тәсілдерімен жолығамыз, атап айтқанда [10]:

- әртүрлі функциональдық және бөтен текті қоспаларды енгізу, рецептураның бұзылуы салдарынан сапалы бұрмалау;

- МЕМСТ бойынша өндірілетін танымал классикалық шарттар бойынша өндірілген сапасы төмен өнімдермен ауыстыру салдарынан ассортименттік ассортименттік фальсификациямен;

- тауар туралы нақты емес немесе бұрмаланған ақпарат салдарынан ақпаратық бұрмалау. Ақпараттық бұрмалау өнімнің шикізат құрамы және оған енгізілетін тағамдық қоспалар туралы бұрмаланған деректерді ғана емес, сонымен қатар трансгендік өсімдік компоненттерін қолданған жағдайда өнімде ГМО-ның болуы туралы таңбалаудың жоқтығын да қамтиды [10,12-13].

1.2 Полимеразды тізбекті реакция

Полимеразды тізбекті реакция 1983 жылы Кэри Мюллис ойлап тапты. Кейіннен осы еңбегі үшін Нобель сыйлығын алды. Қазіргі уақытта ПТР – ауруларды диагностикалау үшін (тұқым қуалайтын, жұқпалы), әкелікті анықтау үшін, гендерді клондау, мутациялар енгізу, жаңа гендерді бөлу үшін кеңінен қолданылады [14]. ПТР әдісі зерттелетін үлгінің ДНҚ санын бірнеше есе ұлғайтуға (амплификациялауға) мүмкіндік береді. ПТР жүргізу үшін мынадай компоненттер қажет [15]:

- ДНҚ – амплификациялауды талап ететін ДНҚ бөлігі бар матрица;
- Праймерлер – праймерлерді дұрыс таңдау амплификация жүргізу үшін маңызды рөл атқарады, бұл талдау жүргізу сапасына әсер етеді;
- Термотұрақты ДНҚ-полимераза;
- Дезоксинуклеотидтрифосфаттар (А, G, C, T); Mg^{2+} ионы, полимераза жұмыс істеу үшін;
- Буферлік ерітінді [15].

Праймерлер – әдетте 15-тен 30 нуклеотидке дейінгі мөлшері бар жасанды түрде синтезделген олигонуклеотидтер. Праймерлер матрицалық - ДНҚ учаскелеріне комплементарлы. ПТР үшін олигонуклеотидті праймерлерді

таңдау маңызды болып табылады. Дұрыс таңдалған праймерлер зерттеу жұмысының ерекшелігіне және сезімталдығын қамтамасыз етеді [16].

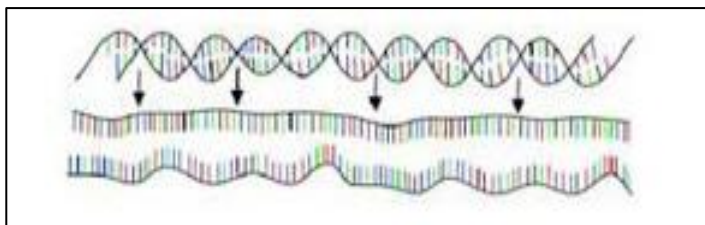
Таg-полимераза ферменті - термостабильді ДНҚ-полимераза, синтезделген ДНҚ-ның өсіп келе жатқан тізбегіне нуклеотидті негіздерді біртіндеп қосу жолымен праймерлер тізбегінің ұзаруын катализациялайды. Фермент өз атауын *Thermis aquaticus* термофильді бактериялардан штамм-продуцент атауымен алды [15-16].

Дезоксинуклеотидтрифосфаттар (дНТФ) қоспасы – жаңа комплементарлы ДНҚ тізбектерін синтездеуге арналған материал болып табылатын төрт дНТФ қоспасы. Классикалық ПТР-да комплементарлы тізбектерді синтездеу үшін дезоксиаденозинтрифосфат, дезоксигуанозинтрифосфат, дезоксицитозинтрифосфат және тимидинтрифосфат құрылыс материалы ретінде пайдаланылады [17].

Буферлік ерітінді- құрамында Mg^{2+} ионы бар, ферменттің белсенділігін қолдау үшін қажетті реакциялық орта. Mg^{2+} ионы ПТР-дағы ДНҚ-полимеразаға қажетті кофактор болып табылады. Реакциялық қоспаның көптеген компоненттері осы иондар, соның ішінде ДНҚ-матрица, праймер, ампликондар және дНТФ байланыстырады [17].

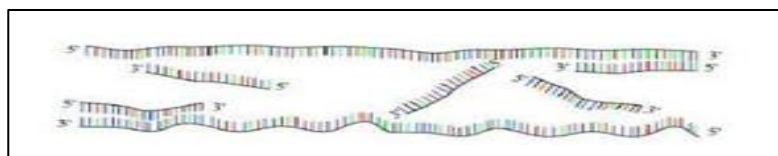
Амплификацияның әрбір циклі ДНҚ репликациясының нақты биологиялық процестерін көрсететін 3 кезенді қамтиды [16].

1-кезең: ДНҚ Денатурациясы. Екі тізбекті ДНҚ-ны бір тізбекті ДНҚ—ға айналдыру үшін жоғары температурада балқыту арқылы [18].



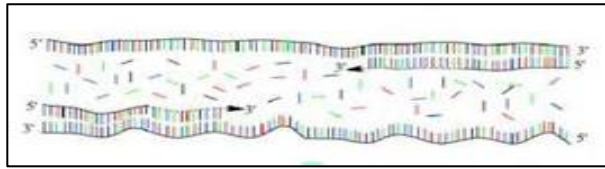
1 Сурет – ДНҚ денатурация кезеңі

2-кезең: Күйдіру (гибридизациялау). Мақсатты ДНҚ үшін праймер ретінде қолданылатын екі олигонуклеотидті күйдіру [18].



2 Сурет – Праймер қосу кезеңі (күйдіру)

3-кезең: ДНҚ тізбегінің ұзаруы. Катализатор ретінде ДНҚ полимеразаны және Mg^{2+} ионын пайдалана отырып, праймерден бастап, нуклеотидтерді қосу арқылы ДНҚ тізбегінің ұзаруы [18].



3 Сурет – ДНҚ тізбегін аяқтау кезеңі

Ең қолайлы және электрофорез сатысын талап етпейтін әдіс Real-Time ПЦР болып табылады. Бұл әдістің мәні ампликацияның әрбір циклінде ампликондардың жинақталуын көрсететін флуоресценцияны анықтауға мүмкіндік беретін арнайы аспаптың көмегімен ампликация өнімдерінің жинақталуын зерттеуден тұрады. Бұл тәсілде праймерлер қоспасына тағы бір маңызды компонент – Зонд қосылады. Бұл ДНҚ фрагменті, флуоресцентті бояғыш және олигонуклеридтің 5' және 3' ұштары бойынша орналасқан флуоресценцияның сөндіргіші бар. Зонд ампликонның ішіндегі тізбектердің біріне комплементарлы және ДНҚ праймер берген фрагментінің полимеразасын көшіру барысында полимеразаның 5'-3' экзонуклеазалық белсенділігінің есебінен ыдырайды. Маркерлік генге Зонд бір түспен боялады, зерттелетін генге зонд басқа түспен боялады [19].

1.3 Ет өнімінің құрамын идентификациялау

Ет өнімінің құрамын анықтаудың биохимиялық, органолептикалық, морфологиялық, иммунологиялық түрлері бар [20]. Иммунологиялық тәсіл ет өнімін өндіру кезінде қолданылған ет және өсімдік ақуыз шикізатының түрлілігіне қатысты күмән болған кезде пайдаланылады [21,22,25]. Иммунологиялық әдіс негізінде иммуногендер мен антиденелер арасында «антиген-антидене» комплексі пайда болады [23-24]. Бұл жағдайда антигендер зерттелетін биологиялық нысанның тек осы түріне тән ақуыздар болып табылады, дәл осы қасиет пен түрлік спецификалық сарысулардың көмегімен еттің бұрмалануын анықтауға болады [25,26,27].

Ұсақталған шикізат компоненттерінің түпнұсқалығын анықтау қажет болған жағдайда, сондай-ақ тиісті ішкі органдардың тұтастығы бұзылған жағдайларда органолептикалық (мультисенсорлық) бағалау әдісі қолданылады [28].

2 Зерттеу жұмыстары

2.1 Зерттеу материалдары мен әдістері

Қазақ Ұлттық Аграрлық Университетінің Қазақ – Жапон инновациялық Орталығында (КЯИЦ) «халал» азық-түлік өнімдерінің талаптарына сәйкестігін анықтау мақсатында шошқа антигенін сапалы анықтау үшін иммунохроматографиялық тестті пайдалана отырып етті, ет өнімдерін және шұжық өнімдерін ПЦР нақты уақыт режимінде зертханалық зерттеулер жүргізілді.

Зерттеу материалдары ретінде Алматы қаласының сауда орталықтарында, базарларында сатып алынған жануарлардың тиісті түрлерінің (сиыр еті, жылқы еті, қой еті, тауық еті, шошқа еті) салқындатылған және мұздатылған ет үлгілері, ет өнімдері (колбаса, фарш, шұжық) болып табылады. Азық – түлік өнімдерінің үлгілерінің құрамына кіретін ет түрлерін сәйкестендіруге қолданылатын шикізаттың шығу тегін анықтау және қадағалау кезінде, сондай-ақ өңдеу процесінің сапасын бақылау, өндірістік желілерде тазалықты сақтау үшін зерттеудің маңызды сатысы болып табылады. RapidFindertm Pork ID Kit реагенттер жинағы ПЦР нақты уақыт режимін қолдана отырып азық – түлік өнімдері мен жемдерден шошқа ДНҚ-н анықтауға болады.

Зерттеу үшін сынамалар МЕМСТ 26668-85 бойынша алынады. Микробиологиялық талдау үшін сынама алу әдістері «шұжық өнімдері және шошқа етінен, қой етінен, сиыр етінен және сойылатын жануарлар мен құстардың басқа түрлерінің етінен жасалған өнімдер ГОСТ 9792-73 бойынша жүргізіледі. Зерттеу материалын стерильді ыдыстарға (банкаларға, пробиркаларға, сауыттарға), жаңа полиэтилен пакеттерге, стерильді пергаментті қағазға салады, мұқият тығындайды және буып – түйеді. Сынамаларды 15 мин қайнатылған стерильді бір рет қолданылатын ыдыстарға, стакандарға алуға болады. Ыдысты дезинфекциялау құралдарымен өңдеуге жол берілмейді. Әрбір сынама материал атауы мен оны алу көзі бар заттаңбамен жабдықталады. Өнімдер сынамаларын жіберген кезде тәуекел факторы ретінде өнімдердің қайсысы күдікті екенін қосымша көрсетеді.

2.1 Қолданылатын реагенттер мен құрылғылар

Жиынтықта:

- нақты уақыт режимінде ПТР өткізу үшін қажетті барлық реагенттер;
- FAM белгіленген ерекше зонд, сондай-ақ митохондрияльды ДНҚ шошқа праймері, фермент және буферлік компоненттер;
- Ішкі оң бақылау (IPC)-VIC белгіленген зондтар, праймерлер және ПТР ингибициясын бақылауға арналған үлгі (реагенттерге қосылған);
- шошқа ДНҚ детекциясын растау үшін оң бақылау.

1 Кесте – Реагенттер жиынтығы 48 реакцияға есептелген

Компонент	Саны	Сақталуы
Мастер Микс Свиной (зеленая крышка)	360 мкл	-20°C
Общий Мастер Микс (белая крышка)	600 мкл	+4°C
Положительный контроль (зеленая крышка)	100 мкл	-20°C

2 Кесте – Керекті материалдар мен құрылғылар

Атауы	Кат.№
Нақты уақыт режимінде ПТР Applied Biosystems термоциклері: - StepOne™ Real-time PCR System - StepOnePlus™ Real-Time PCR System - 7500 Fast Real-Time PCR System - 7500 Real-Time PCR System	
Өзгерілетін көлемі бар Дозаторлар (10мкл, 20мкл, 200мкл)	
ПЦР үшін адаптерлері бар үстел центрифугасы	
Планшет немесе пробирка	
Вортекс	
Пайдаланылатын жабдыққа сәйкес оптикалық планшеттер және қаптамалар немесе ПЦР пробиркалар және қақпақтар	
7500 Real-Time PCR System қолдану үшін	
Планшет MicroAmp Optical Reaction Plate	Cat.no. 4306737
Жабынды MicroAmp Optical Adhesive Film	Cat.no. 4311971
Стрипы MicroAmp Fast 8-Tube Strip, 0.1ml	Cat.no.4358293
StepOne™ Real-Time PCR System қолдану үшін	
Планшет MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate	Cat.no. 4346907
Жабынды MicroAmp 48-Well Optical Adhesive Film	Cat.no. 4311971
Стрипы MicroAmp Fast 8-Tube Strip 0.1 ml	Cat.no. 4358293
Жоғарыда аталған құрылғылармен пайдалану үшін	
MicroAmp Optical 8-Can Strips түріндегі қақпақ	Cat. no. 4323032
Басқада материалдар	
Дозаторларға арналған аэрозольдық сүзгісі бар ұштар	
1,5 мл нуклеазсыз микроцентрифугалық пробиркалар	
Тальксыз қолғап	
Реагенттер	
ДНҚ бөлуге арналған набор	
Құрамында нуклеаз жоқ су	

3 Кесте – 10 % артық есебімен реакциялардың қажетті саны үшін келесі компоненттерді біріктіру

Компонент	Көлем (1 реакция үшін)
Мастер Микс Свиный	7,5 мкл
Общий Мастер Микс	12,5мкл

Нақты уақыт режиміндегі ПТР қондырғысын өндірушінің нұсқаулығына сәйкес, келесі параметрлерді қолданып іске қосу:

- реакция көлемі – 25 мкл; пассивті референс бояғыш ROX;

4 Кесте – TaqMan зонд үшін бояғыштар мен сөндіргіштер

Нысана	бояғыш	сөндіргіш
Шошқа	FAM	MGB
IPC	VIC	MGB

5 Кесте – 25 мкл реакциялық қоспа үшін ПТР қоспасын есептеу үлгісі

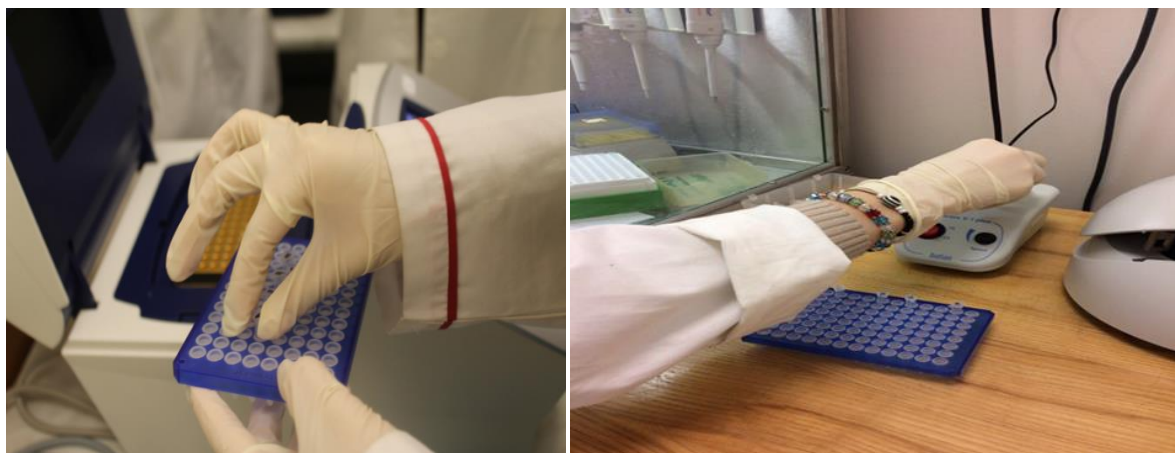
Реакциялық қоспа компоненттері	Бастапқы концентрация	Реакциялық қоспаның көлемі (мкл)
Деиондалған су		18,8
Құрамында MgCl ₂ бар Буфер	10 x	2,5
dNTP	10 мМ	0,5
Праймер қоспасы	10 мкМ	0,75
TaqMan: Rox	30 мМ	0,25
OneTaq Polymerase (NEB)	5 ед/мкл	0,2
ДНК	10 нг/мкл	2

2.3 ДНҚ экстракциясы

Зерттелетін нысанның 10-20 г үлгісін алу үшін экстракция әдісі арқылы ДНҚ үлгіні дайындау қажет, кейіннен алынған ДНҚ үлгіні ПТР үшін 10 нг/мкл дейін сұйылту қажет.

Реактивтерді дайындау мақсатында лизирлеуші буфер 60 °С термостатта қыздырып, тұнба толық ерігенше бірқалыпты айналдырумен араласты. Сорбенті бар пробикаларды қажетті мөлшерде бөлме температурасына дейін жеткізіп, тамшыларды шығару үшін қысқа уақыт ішінде центрифугалады. ДНҚ бөлу үшін зерттелетін материалмен таңбаланған әрбір пробиркаға 800 мкл лизирлеуші буфер және 15 мкл протеиназа К енгізіп вортексте мұқият араластарылды. Бұдан әрі, қоспаны +60° С температурада 60 минут инкубациялап, әрбір 15-20 мин вортексте араласты. 12-14 мың айн/мин кезінде 5 минут шыны түтіктерді суытып, центрифугалады. Содан кейін жоғары су фазасы 600 мкл аспайтын , аэрозольдық бөгеттері бар жекелеген ұштарын «Эппендорф» типті 1,5 мл жаңа пробиркаларға ауыстырды. Әрбір түтікке 500 мкл хлороформ енгізді, 10 минут ішінде 10-14 мың айн/мин аралықта центрифугалады. Әрбір сынама үшін Tips-ті пайдалана отырып, супернатантты алыс тастады. Одан әрі, 500 мкл шаю ерітіндісін тұнбаға қосып, сорбентті барынша ресуспензиялауға дейін вортексте қарқынды араласты. Суспензияны 7 мың айн/мин 30 секундта центрифугалады. Әрбір сынама үшін жеке ұштықты пайдаланы супернатантты алып тастады. Содан кейін, ашық қақпағы бар пробирканы термостатқа сұйықтықтың булануы үшін +60° С 5 минутқа орналастырдық. Құрғақ шөгуге 100 мкл TE – буфер қосылды, вортексте

араластырылды. +60°C температурада 10 минут инкубациялап, әрбір 2 минут сайын араластырылды. Суспензияны 12-14 мың айн/мин 2 минут ішінде центрифугалау. Таза отырғызылатын сұйықтық көлемі 0,5 немесе 1,5 лм жаңа таза пробиркаға алынды.



4 Сурет – ДНҚ үлгіні дайындау процесі

2.3 Амплификация реакциясы

Амплификация StepOnePlus™ Real – Time PCR System Applied Biosystems жүйесін пайдалану арқылы жүргізілді.

Пробиркаларға мөлшерлегіштің көмегімен ДНҚ үлгісін 2 мкл – нан Tips – ты пайдалана отырып біртіндеп енгіздік, әрі қарай 23 мкл реакциялық қоспа қосылды. Қолданар алдында праймерлер қоспасын ерітіп, пробиркалардың ішіндегісін сілкілеуге арналған аппаратта қысқа уақытта араластырып, 10-30 секунд центрифугаладық. Пробиркалардың ішіндегісін ампликациялау үшін арнайы пробиркаларға тасымалдадық.



5 Сурет – Үлгілерді амплификациялау кезеңіне дайындау

Дайын ПЦР – қоспасы бар тығыз жабық пробиркалар амплификаторға салып, амплификация бағдарламасын іске қосты.

6 Кесте – Амплификациялау параметрлері

Параметр	1-кезең Активация энзима	2-кезең ПЦР	
Циклдар саны	1	36	
		денатурация	Күйдіру/элонгация
Температура	95°C	95°C	60°C
Уақыт	10 минут	15 Секунд	1 минут

Амплификатордағы амплификацияның жалпы уақыты шамамен 1 сағат. ПТР өнімдерінің детекциялары қолданылатын амплификатор моделінің сипаттамасына сәйкес жүргізілді. Аспаптың бағдарламасы талдау параметрлерінің көмегімен деректерді автоматты түрде талдайды, содан кейін амплификация графигінің терезесін көрсетеді.



6 Сурет – ПТР нақты уақытында ДНҚ диагностикасы нәтижелері

Ет үлгілерінің 10 нг/мкл ДНҚ концентрациясына шамамен 0,01% шошқа ДНҚ сәйкес келеді.

3 Зерттеу нәтижелері

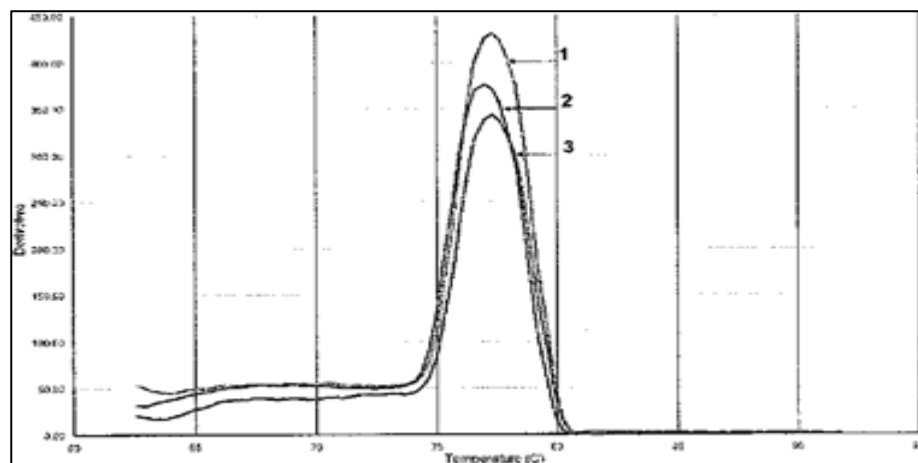
3.1 Primer Express 2 бағдарламасымен праймерлерді құрастыру

Іріктеу кезінде базалық бағдарлама Primer Express 2 (Applied Biosystems) компьютерлік бағдарламасы қолданылды. Ол арқылы ПТР-ны нақты уақыт түрлендіру үшін қажетті праймерлер мен тасымалдаушы флуорофор және сәндіргіш зондының дизайны үшін таңдалған ДНҚ учаскелерін талдауды жүзеге асырды. Праймерлерлерді таңдаудағы негізгі өлшем келесі параметрлер бойынша болды: ПТР өнімнің көлемі шамамен 50 п.н.; балқу температурасы 58-60 °С; праймердің ұзындығы 20-30 п.н.; GC құрамы 20-80%; қайталама құрылымдардың жоқтығы; ең аз GC 3'праймерлердің соңында (соңғы бес нуклеотидтердің үштен көп емес). Сондай-ақ зонд жалпы қабылданған параметрлерді басшылыққа ала отырып таңдады: GC құрамы 20-80%; балқу температурасы 68-70 °С; қатарынан бірдей нуклеотидтердің минимумы, әсіресе G: қатарынан 4-тен артық емес. Сынамада G қарағанда жиі кездесетін ДНҚ тізбегін таңдады; 5'-соңында G болмауы тиіс; флуоресцентті белгі - FAM, сәндіргіш – MGB.

Талдау нәтижесінде бағдарламада келтірілген нұсқалардан жоғарыда көрсетілген барлық талаптарға жауап беретін құрамында еттің, ет және өсімдік ингредиенттерінің түрлік тиістілігін сәйкестендіру мақсаттары үшін барынша оңтайлы зонд, праймерлер таңдап алынды.

3.2 Амплификацияның оңтайлы шарттарын таңдау

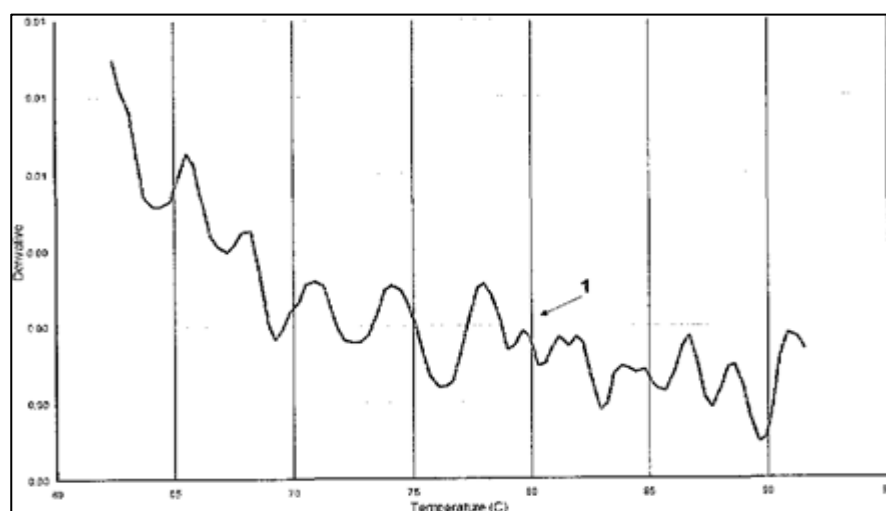
Амплификацияның оңтайлы шарттарын таңдау үшін реакциялық буфердегі концентрациясының әртүрлі құрамы мен және оларды күйдіру температурасымен зерттеулер жүргізілді. Праймерлердің оңтайлы шоғырлануын өңдеу параметрлерді балқытудың есептік температурасына және реакциялық қоспадағы тұз концентрациясына сүйене отырып жүргізілді. ПТР нақты уақытыда амплификация жүргізу үшін 2,5 x реакциялық қоспа пайдаланылды. Осы қоспадығы тұздың концентрациясы амплификациялық қоспаның жалпы көлеміне есептегенде 25 мкл. Өңдеу үшін Primer Express 2 бағдарламасына сәйкес, 50-ден 200 пМ-ге дейін молярлық концентрациясы бар праймерлер қолданылды. Бірінші кезеңде реверс праймердің тиімділігі пысықталды, оның концентрациясы 50-ден 200 пМ-дейін өзгерген, ал форвард праймердің 150 пМ тұрақты шоғырлануы болды. Эксперименттің екінші кезеңінде тиімділік форвард праймер бойынша пысықталды, 50-200 пМ шоғырлану диапазонында, сонымен қатар реверс праймер 150 пМ тұрақты шоғырлануы болды. Үшінші кезеңде біз екі форвард/реверс праймері бойынша концентрацияны өңдеу үшін праймерлердің бақылау қоспаларын құрдық, қоспалардағы концентрациялар (Б- форвард, Я-реверс): 50/50, 100/50, 100/100, 100/150, 200/200.



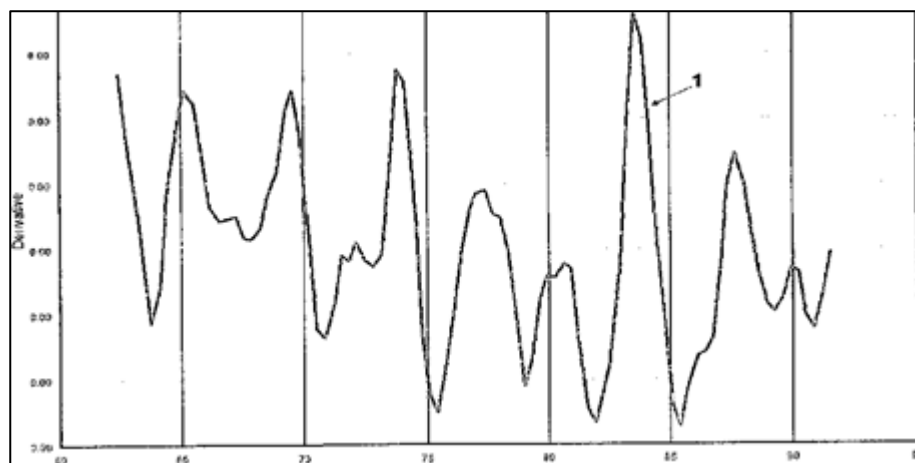
7 Сурет – Үй шошқасының ДНҚ үлгілерінің нақты уақыт ПТР нәтижесінде диссоциация графигіндегі флуоресценция шыңдары
 Әртүрлі концентрациядағы праймерлермен 1-концентрация Б/Я 100/150пМ; 2-концентраци Б/Я 100/100пМ; 3-концентрация Б/Я 100/10 пМ

Нәтиже праймерлердің оңтайлы шоғырлануы туралы айтуға болатын диссоциация графиктері түрінде ұсынылған, сондықтан флуоресценция шыңыжоғары және тегіс, праймерлер қоспасы соғұрлым тиімді. Сурет бойынша, Б/Я праймер концентрациясының ең оңтайлы арақатынасы 100/150 пМ арақатынасы болып табылғаны көрініп тұр. Диссоциация кестесіндегі праймерлер жұбының шоғырлануының жеткіліксіздігі флуоресценцияның шағын шыңдарының көлденең құдырауы түрінде байқалады, мысалы, Б/Я 50/50 пМ арақатынасында (8 Сурет).

Б/Я 200/200 пМ арақатынасында реакция да өткен жоқ, сурет 9 көптеген өткір шыңдар флуоресценция түрінде спецификалық емес күйдіру қисығы көрінеді, бұл праймерлердің шоғырлануын қайта сынау туралы куәландырады.

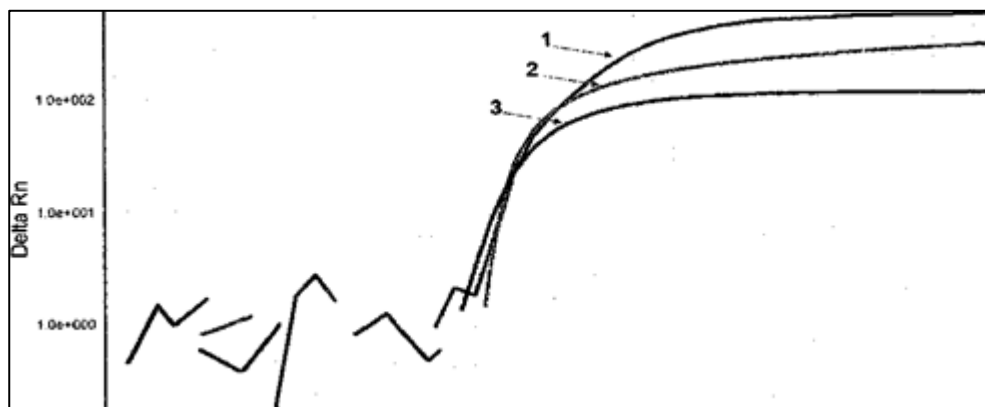


8 Сурет – F/R 50 пМ концентрациясы видеоспецификалық праймерлері бар үй шошқалары ДНҚ үлгісінің нақты уақытында ПТР нәтижесінде диссоциация графигіндегі флуоресценция шыңдары



9 Сурет – F/R 200/200 нМ концентрациясы видеоспецификалық праймерлері бар үй шошқалары ДНҚ үлгісінің нақты уақытында ПТР нәтижесінде диссоциация графигіндегі флуоресценция шындары

Осы эксперименттің қорытындысы бойынша форффард пен реверс праймерлердің шоғырлануы диссоциациясы сатысының нәтижелеріне сүйене отырып анықталды. Бұдан әрі зондтар шоғырлануы іріктелді, бұл жағдайда есепке алу зондтары күйдірудің флуоресценция және тиімділік дәрежесі бойынша жүргізілді. Сондай-ақ алдыңғы кезеңде жасалған қоспалары бар әр түрлі зондтың концентрациясы диапазонында 50-100 пМ, реверс және форвард праймері қоспадағы болған оңтайлы концентрациясы. 9 сурет мысал ретінде сояға арналған түрлік спецификалық праймерлер қоспасындағы зонда концентрациясын таңдай бойынша нәтиже берілген.



10 Сурет – Әртүрлі концентрациядағы праймерлері және зондымен соя ДНҚ үлгілерінің нақты уақытында ПТР жәтижесінде жинақталған өнімдердің флуоресценция қисықтары

1-100 пМ зондтың шоғырлануы; 2- 75 пМ зондтың шоғырлануы; 3- 50 пМ зондтың шоғырлануы

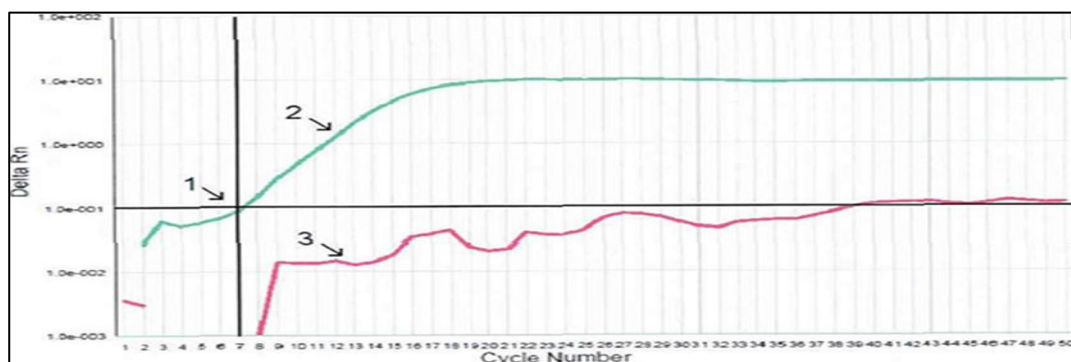
10 суретте көрсетілгендей 100 пМ зондының концентрациясы бар сынаманың флуоресценция сигналын тіркеу ең жоғары деңгейде болды. Демек,

осы концентрацияның зонды құрамында соя бар үлгілердің амплификациясы өнімдерінің флуоресценттік детекциясын жүзеге асыру үшін неғұрлым тиімді.

Әртүрлі температура кезінде амплификацияның тиімділігі праймерлердің әрбір жұбы үшін бөлек зерттелді. 58-ден 60°C дейінгі диапазонда праймерледі күйдіру температурасының өзгеруі тесттің сезімталдығына әсер етпеді, ал күйдіру температурасының 62°C дейін артуы амплификация сезімталдығын азайтады. Күйдіру температурасы 58 °C төмен болғанда көптеген жағдайларда ерекше емес фрагменттер байқалды. Жүргізілген экспериментер нәтижесінде барлық құрастырылған праймерлер табысты жұмыс істейтін амплификацияның оңтайлы параметрлері анықталды (кесте 10).

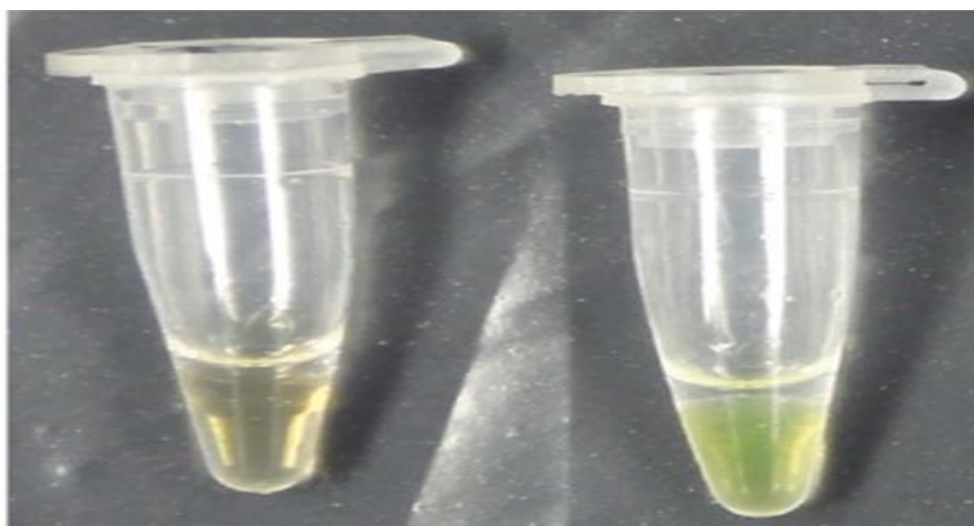
7 Кесте – Нақты уақыт режимінде амплификация параметрлері

Амплификация этаптары	Температура С ⁰	Уақыт, с	Процесс	Цикл саны
1	95	42	ДНҚ денатурациясы	1
2	95	15	ДНҚ денатурациясы	45
	58	50	Праймер күйдіру және ДНҚ синтезі	



11 Сурет – Алынған ПТР жинақталған өнімдерінің флуоресценциясының қисығы, ПТР нақты уақыт режимінде

1 – ПТР log – фазасының басталу нүктесі және оған сәйкес келетін орындалған циклдердің саны; 2 – бөтен ДНҚ-ның бар екендігін куәландыратын қисық амплификация; 3 – бөтен ДНҚ-ның жоқ екендігін куәландыратын қисық амплификация

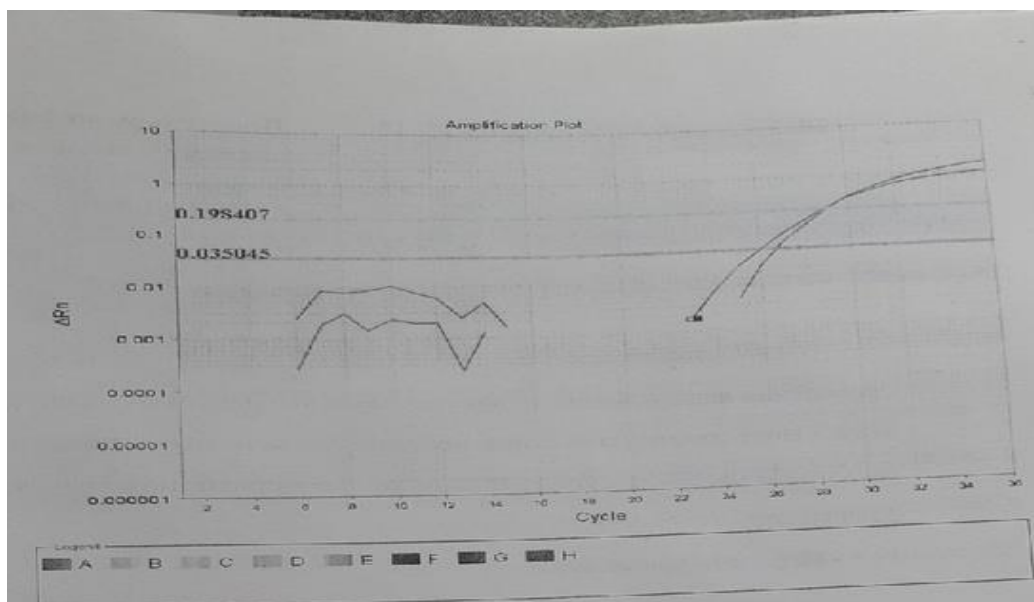


12 Сурет – Зерттеу нәтижесінде алынған үлгі

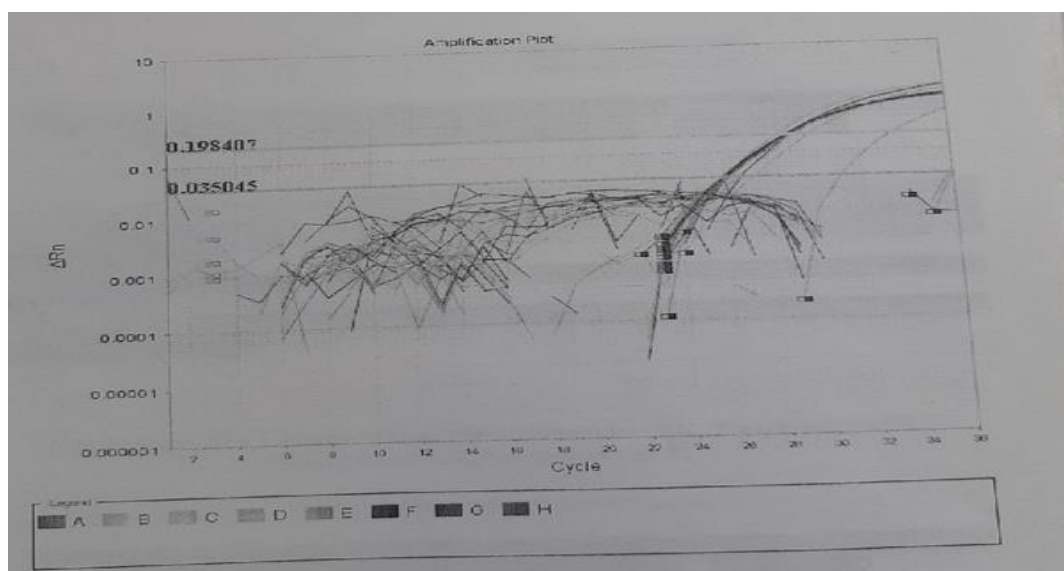
8 Кесте – Зерттеу нәтижесінде алынған нәтижелер

№	Үлгі атауы	Шошқа ДНҚ-ның болуы
1	Докторская (пісірілген шұжық)	-
2	Сосиски говяжьи Беккеи и К	+
3	Говяжья (пісірілген шұжық)	-
4	Сардельки – Первомайский Халал (пісірілген шұжық)	+
5	Сервелат особый (пісірілген шұжық)	-
6	Сосиски Халал – Султан (сиыр еті)	-
7	Чайная (пісірілген шұжық)	+
8	Диетическая (пісірілген шұжық)	+
9	Фарш говяжий Fridge	+
10	Жамбон говяжий (пісірілген шұжық)	+

Зерттеу нәтижесінде алынған 10 сынаманың 6 сынамасынан шошқа ДНҚ бар екендігі анықталды. ПЦР талдау кезінде «халал» деп жүрген өнімдердің антигендерімен шошқа етінің «ластануы» анықталды.



13 Сурет – Real Time PCR шошқа ДНҚ диагностикасы нәтижелерінің графикалық бейнесі



14 Сурет – Real Time PCR шошқа ДНҚ-ның нәтижелерінің графикалық бейнесі

3.3 ПТР әдісін нақты уақытта қолданудың шектеуші факторларын анықтау

Белгілі болғандай, сезімталдық және ерекшелік көрсеткіштері бойынша ДНҚ зерттеулеріне негізделген әдістер қазіргі уақытта бар идентификация әдістерінен айтарлықтай асып түседі. Алайда, оларды қолдану белгілі бір шектеулерден айырылмаған. Дайын ет өнімі құрамында құрамында биологиялық объектілерді түрлік идентификациялау үшін ПТР пайдаланудың

лимитеуші факторларын анықтау мақсатында әртүрлі физикалық, химиялық және механикалық әсерлерге ДНҚ лабильділігі зерттелді.

Ет шикізатына төмен және жоғары темпратуралардың әсері бұлшық ет тінінің құрылымдық өзгерістерін тудырады. 0,5-5°C температурада мұз кристалдарының пайда болуымен судың қатуы басталады, соның салдарынан бұлшықет талшықтарының деформациясы және бұзылуы болады. -18°C кезінде еттегі судың 75% -дан астамы қатады. Еттің барлық ерітінділерінің толық қатуы -56°C. Қайта мұздату кезінде талшықтардың одан да үлкен бұзылуына және дегидратацияға әкеліп, мұз кристалдары қайта түзіледі. Бұл үдерістер барысында тек тіннің деңгейінде ғана емес, сонымен қатар жасушалық құрылымдарда, атап айтқанда ДНҚ бұзылулар ықтималдығы бар.

Жоғары температураның ет шикізатына әсері, мысалы, стерилизация, пастерлеу, кептіру және т.б., ДНҚ денатурациясына әкелуі мүмкін, ол нуклеин қышқылының екі нүктелі құрылымын бұзудан, бірақ ДНҚ негізінде көптеген талдау жүргізу үшін қажет бір нүктелі құрылымын сақтаудан тұрады. Алайда, ДНҚ деградацияның одан әрі қайтымсыз бұзылуы мүмкін, ол ұзақ полимерлі молекуланың жекелеген фрагменттерге ыдырауына алып келеді, сол арылы әдіс сезімталдығының төмендеуіне алып келеді. Етті тұздау езінде негізінен ақуыз құрылымдары өзгеріске ұшырайды. Тұндыру кезінде тұз еритіе ақуыздардың миофибриллден сарколемма арқылы фарштың сұйық фазасына біртіндеп диффузиясы жүреді, еттің жабысқақтығы және сұйық фазаның тұтқырлығы артады. Бұлшықет талшықтарының бұзылуы жіне ДНҚ деградациясы тұздау кезінде болмайды. Етшіру процесінде бұлшық ет талшықтарының құрылымы өзгереді, көлденең сызғыштығы тегістеледі және жоғалады, ядро әлсіз боялады, содан кейін жойылады, бұлшық ет талшықтарының арасындағы байланыс әлсірейді. Митохондрия ең тұрақты құрылымдар болып табылады, бірақ шіру процесінде бұзылса да ДНҚ өз құрылымын сақтайды.

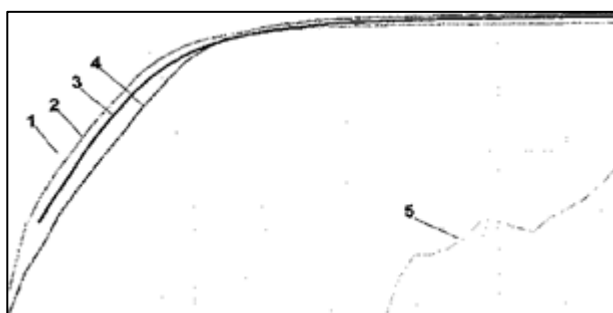
ДНҚ-ға етті механикалық ұсақтау әсер етуі мүмкін, оның барысында фибрилл және бұлшықет талшығының сарколеммасы құрылымының ішінара бұзылуы орын алады, демек ДНҚ тізбегінің механикалық «үзілуі» орын алуы мүмкін.

Осы фактілерді ескере отырып, ДНҚ лабильдігін тәжірибелік жолмен анықтау үшін тәжірибелік үлгілер төмендегідей дайындалды. Салмағы 300 г, 1 ай бойы -20°C сақталған сиыр етін ерітіп, ұсақтауға арналған тостағышқа салып, 300 мл натрий – фосфат буферін (PBS) жақсы гомогенизация үшін қосты. Бұдан әрі блендер біртекті жағдайға – пюреге дейін жеткізді. Алынған массаны 5 бөлікке бөлді. Бірінші бөлігі одан әрі өзгеріссізге қалады, келесі екі бөлігі жоғарғы температурамен өңделді. Төртіншіге натрий нитриті қосылды, оның салмақты үлесі 0,1 % құрады. Бесінші бөлігі етті шіріген кезде бөлме температурасында қалдырды. Осы тәжірибелік үлгілерден басқа төмен температурада ұзақ сақталатын сиыр еті алынды. Осылайша, кестеде ұсынылған үлгілердің тәжірибелік панелі жасалды (14 кесте).

Бұдан әрі осы тәжірибелік үлгілерден ДНҚ бөлініп нақты уақыт режимінде амплификация қойылды. Сурет № үлгілерді амплификациялау

қорытындысы бойынша мұздату режимдерінің әсерін бақылау бойынша нәтиже келтірілген. Суреттен көрініп тұрғандай, амплификацияның спецификалық реакциясы барлық тестіленетін үлгілерде байқалды, алайда мұздатылған үлгілердегі флуоресценция сигналының едәуір ұлғаюы эталондық үлгіге карағанда бірнеше циклға кейінірек тіркелді. Эксперимент деректерді қатыру процестері ДНҚ деградация дәрежесіне аз әсер ететінін және идентификация әдісінің диагностикалық қабілетіне әсер етпейтінін көрсетті.

Delta Rn vs Cycle



6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
Cycle Number

15 Сурет – Нақты уақытта ПТР нәтижесінде жинақталған амплификация өнімдерінің флуоресценция қисықтары
1- эталондық ДНҚ үлгісі; 2- №8 үлгі; 3- №9 үлгі; 4- №10 үлгі; 5 – теріс бақылау үлгісі (TE- буфер)

Барлық тәжірибелі үлгілер пюрениң консистенциясына дейін ұсақталғанын атап өткен жөн, осылайша етті механикалық ұсақтау әдістің сезімталдығы мен ерекшелігіне әсер етпейтіні расталды.

Эксперименттер нәтижесінде ПТР нақты уақыт негізінде идентификация әдісі ет, ет өнімдерінің түрлік тиістілігін анықтау үшін, оның ішінде тамақ өнімдерінің құрамында, оларды өндіру технологиясына қарамастан қолдануы мүмкіндігі анықталды.

ҚОРЫТЫНДЫ

Талдау жүргізу үшін әртүрлі GMO EXTRACTION KIT үлгілерінен ДНҚ бөлу жинағы және индикаторлық жолақтар қолданылды. Геномдық ДНҚ бөлу жиынтық хаттамасына сәйкес жүргізілді. ПТР нақты уақыт режимі шошқа ДНҚ анықтау және қолданылатын шикізатты бақылау үшін, сондай – ақ өңдеу процестерінің сапасын бақылау және өндірістік желілерде тазалықты сақтау үшін Rapid Finder tm Pork Kit, Life technologies реагенттер жиынтығын пайдаланды. ДНҚ идентификациясы (*Sus scrofa*) 10 % артық соманы ескере отырып, компоненттерді дайындаумен жүргізілді.

ПЦР талдау арқылы ет өнімдерінің «ластануы» анықталды. Ең алдымен, бұл «халал» өнімдерін өндіру кезінде шикізат пен қосалқы материалдарға қойылатын талаптардың бұзылуынан болып тұр. Зерттеу нәтижесінде ПТР Real-Time әдісімен 64 сынамада шошқа ДНҚ бар екендігі анықталды. Осылайша «Халал» маркалы өнімдердің заттаңбада көрсетілген ақпарат көрсеткіштерінің бұрмалануы жүзеге асып тұр.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Инструктивный материал: «международные стандарты по пищевой безопасности» АО «Национальные агентство по экспорту и инвестициям «KAZNEX INVEST» г.Астана,2011г.
- 2 Кузнецова О.А., Юрчак З.А., Утьянов Д.А. Маркировка мясной продукции: новые требования техничекй регламентов Таможенного союза//Мясная индустрии.-2015.№2
- 3 Нормативный документ MS 1500: 2004 Halal Food (приказ №022/879 Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли от 09.11.2005 г.)
- 4 Г.Б. Рысбаева - Халал индустриясының Қазақстандағы хал-ахуалы//Central Asian Economic Review - 2010 г.№6
- 5.Махметов Б.Н. Развитие системы Халал в Республики Казахстан//Пищевая и перерабатывающая промышленность Казахстана.-2008.-№1.
- 6 ГОСТ: Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС).Минск,- с.4-5
- 7 Тертон Д., Грин Н., Стаут У. Биология. – Мир, 2006 – том 3. – 453 с.
- 8 Чепурный И.П. Идентификация и фальсификация продовольственных товаров. – М.: Издательско – торговая корпорация « Дашков и К», 2002. - 460 с.
- 9 Хвьяля С.И., Паршенкова Р.В. Мясная промышленность России: проблема фалсификации//Мясной бизнес. – 2006. - №5(45). – С.104-105.
- 10 Шалимова О.А., Козлова Т.А., Зубарева К.Ю., Радченко М.В. Анализ основных тенденций фальсификации мясопродуктов, реализуемых на потребительском рынке Орловской области // Сборник докладов 14-ой МНПК памяти В.М. Горбатова. – 2011. – С. 252-259.
- 11 Окара А.И., Алешков А.В., Кольцов И.П., Лопатин С.И., Генетические модифицированные ингредиенты в мясных продуктах: декларация и реальность // Мясной индустрии. – 2006. - №5. – С. 22-24.
- 12 Лынчиков Д.С., Николаева М.А., Гильмитова И. Идентификация и фальсификация товаров: причины и следствия // Международный сельскохозяйственный журнал. - 1993.- №3. С. 61-64.
- 13 Николаева М.А., Лычников Д.С., Неверов А.Н. Идентификация и фальсификация пищевых продуктов. – М.:Экономика,1996. – 108 с.
- 14 Сингер М., Берг П. Гены и геномы. -М.:Мир, 1998. -том 1. -392 с.
- 15 Бонецкий А.А., Таиров М.М., Кутукеев Т.С. Использование полимеразной цепной реакций (ПЦР) в клинической практике [Электронный ресурс].-2008. – Режим доступа:www.medicus.ru
- 16 Saiki R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase//Science. - 1988. № 239.-P.487.
- 17 Innis M.A., Gelfand D.H. Optimization of PCRs. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T. (Eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and applications/New York: Academic Press. - 1990.-P.3-12.

- 18 Комарова И.Н., Серегин И.Г., Валихов А.Ф. Полимеразная цепная реакция-современной метод выявления фальсификации мясного сырья и продуктов// Мясная индустрия. - 2004. - №2. -С.37-41.
- 19 Higuchi R. Kinetic PCR Analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reaction//Biotechnology. -1993. - №11. – P.1026-1030.
- 20 Кабанова Е.М. Определение видовой принадлежности мяса домашних и диких животных//дисс.-Ч., 1999.-С.23.
- 21 Остерман М.Б. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. -М.: Наука, 1988-303 с.
- 22 Фримель Х. Иммунологические методы. -М.: Мир, 1979. – 472 с.
- 23 Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. -М.: Колос, 2003. – 423 с.
- 24 Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1987. – 414 с.
- 25 Галактионов В.Г. Иммунология. Учебник. – М.: изд-во МГУ, 1998. – 480 с.
- 26 Kabat E.A. Structural concept in immunology and immunochemistry, 2nd edition. -N.Y., Hotel, Rinehart and Winston. – 1976.
- 27 Weir D.M. Handbook of experimental immunology. – 3rd edition. – V.
- 28 Селиванова Е.Б. Разработка метода оценки свежести свинины с использованием мультисенсорной системы «VOCmeter». дисс.-М.,2008.-С.23.