УДК 637.07
https://doi.org/10.21603/1019-8946-2023-5-8

Исследование методов экстракции ДНК из сырого молока

Екатерина Германовна Лазарева, младший научный сотрудник
E-mail: e_lazareva@vnimi.org
Алексей Владимирович Хан, инженер
Олег Юрьевич Фоменко, канд. биол. наук, старший научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности

Изучена эффективность методов выделения ДНК для анализа биобезопасности молока и молочных продуктов методом ПЦР. Некоторые компоненты молока, такие как протеазы и ионы кальция, могут существенно снижать эффективность ПЦР и приводить к искажениям результатов. Проведена количественная (концентрация ДНК) и качественная (амплификация с последующим гель-электрофорезом) оценка коммерческих наборов для выделения ДНК «ДНК-сорб-С-М» и «ДНК-Экстран-2» с точки зрения их пригодности при работе с сырым молоком. Качество и количество полученной с их помощью ДНК позволяет успешно проводить последующий молекулярно-генетический анализ безопасности и подлинности молока.

Ключевые слова: *ДНК, полимеразная цепная реакция, молоко, биобезопасность.*

Lazareva E. G., Khan A. V., Fomenko O. Yu. Research of methods of DNA extraction from raw milk
All-Russian Dairy Research Institute

This article presents the results of work on the study of the effectiveness of various methods of DNA isolation for use in the analysis of biosafety of milk and dairy products by PCR. Some components of milk, such as proteases and calcium ions, can significantly reduce the effectiveness of PCR and lead to distortion of the results. We have given quantitative (DNA concentration) and qualitative assessments (amplification followed by gel electrophoresis) to commercial DNA purification kits «DNA-sorb-S-M» and «DNA-Extran-2». The results obtained indicate the applicability of the selected kits for the isolation of deoxyribonucleic acids from raw milk, the quality and quantity of which allows them to be used for the successful subsequent molecular genetic analysis of the safety and authenticity of milk.

Key words: *DNA, polymerase chain reaction, milk, biosafety.*

К качеству и безопасности молока и молочных продуктов предъявляют высокие требования. Основополагающим документом, регламентирующим показатели молока, является ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции». Строгий контроль обусловлен особенностью продуктов животного происхождения. Во-первых, показатели продуктов, получаемых от животных, зависят от множества критериев: сезонность, состояние здоровья животного, порода и т. д. Во-вторых, молоко является многокомпонентной и высокопитательной средой для развития микроорганизмов [1]. В-третьих, важно отметить человеческий фактор, т. е. соблюдение санитарно-гигиенических правил содержания скота.

С развитием аналитических методов нормируемые показатели качества и безопасности молока расширяются. Отдельно стоит упомянуть такой показатель, как количество соматических клеток (SCC), который вызывает интерес со стороны переработчиков по ряду причин. SCC является общепринятым критерием, обычно используемым для оценки как состояния внутриматочного здоровья отдельных животных, так и качества сборного молока, поскольку существует прямая корреляция между качеством молока и SCC [2]. Высокий уровень SCC может представлять значительный риск для здоровья потребителей и, как правило, снижает стабильность и сроки годности сырого молока.

Расширение исследований качества и безопасности молока и молочных продуктов также возможно за счет внедрения молекулярно-генетических методов. В основном ДНК-исследования направлены на оценку молочной продуктивности коров, получение молока с заданными свойствами (сыропригодность, усвояемость белков молока человеком) [3], выявление патогенных микроорганизмов [4]. Однако на данный момент отсутствует единая методика пробоподготовки и экстракции ДНК из молока КРС для дальнейших исследований. Цель работы — изучение эффективности методов выделения ДНК и пригодности основанных на них коммерческих наборов для анализа биобезопасности молочных продуктов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Работа проводилась в Центральной лаборатории микробиологии ВНИМИ. Материалом для исследования служило молоко сырое от КРС с диагностированным лейкозом. Количество соматических клеток определяли с помощью анализатора «DeLaval DCC» (GMU Tumba DeLaval International AB, Швеция) согласно ГОСТ 23453–14. ДНК из анализируемых образцов выделяли с использованием коммерческих наборов «ДНК-сорб-С-М» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и «ДНК-Экстран-2» (ООО «НПФ Синтол», Россия). Концентрацию ДНК в полученных препаратах измеряли на флуориметре «Qubit 4» (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов «Qubit dsDNA BR Assay Kit» (Invitrogen, США). Объем исследуемой пробы составлял 5 мкл.

Выделенные образцы ДНК использовали для постановки ПЦР с использованием реакционной смеси «5x ScreenMix» (ЗАО «Евроген», Россия) и видоспецифических праймеров Bos-F6 5'-CATCAACTTCATTAC AACAATTATCAACATAAAG-3' и Uni-R 5'-CCGAATGGTTCYTTTTTYCCYGAG TAGTA-3' для амплификации участка митохондриального гена COI *Bos taurus* [5]. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. ПЦР проводили на приборе «MiniAmp» (ThermoFisher Scientific, США). ПЦР-продукты разделяли в 2 % агарозном геле (VWR International LLC, США) при напряжении электрического поля 7 В/см с использованием маркера длин ДНК 100–1000 п.н. (ЗАО «Синтол»). Гели окрашивали раствором бромистого этидия. Визуализацию и документирование результатов осуществляли с применением гель-документирующей системы «Vilber E-Box-CX5.TS»

(Vilber, Франция) на трансиллюминаторе «Vilber Super-Bright» (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

Выход суммарной коровьей ДНК из молока во многом зависит от содержания соматических клеток. В исследуемом молоке содержание соматических клеток составило 270±13,5 тыс. ед. на 1 см^3 при нормируемом уровне не более 400 тыс. ед. на 1 см^3.

Выделение ДНК является ключевым моментом для успешного протекания последующих ферментативных реакций. Оптимальная процедура выделения должна обеспечивать эффективную экстракцию нуклеиновых кислот из матрицы и получение на выходе препаратов ДНК, качественно и количественно соответствующих целям дальнейшего исследования [6].

Важным условием протекания ПЦР является использование ДНК, свободной от загрязнений и ингибиторов. Наличие последних может существенно снижать эффективность ПЦР и приводить к искажениям количественной оценки содержания ДНК в пробах, вплоть до возникновения ложноотрицательных результатов [7]. Особенно актуальна эта проблема для образцов сложного состава, к которым, безусловно, относится молоко. Некоторые компоненты молока, такие как протеазы [8] и ионы кальция [9], могут ингибировать ПЦР и искажать результаты исследований. Чтобы выбрать оптимальный способ работы с сырым молоком при оценке его безопасности с использованием молекулярно-генетических методов, предпринята попытка дать количественную и качественную оценку коммерческим наборам для выделения ДНК.

С целью определения воспроизводимости применяемых методов ДНК выделяли из 24 образцов цельного сырого молока объемом 2 мл. Результаты статической обработки полученных данных приведены на рисунке 1.

Применение двухвыборочного t-теста показало, что концентрация ДНК, выделенной с помощью двух наборов, достоверно отличается: при уровне значимости α, равном 0,001, значение p-value составило $1{,}17 \cdot 10^{-11}$. Использование для выделения суммарной ДНК из сырого молока набора реагентов «ДНК-сорб-С-М», содержащего сорбент, позволяет получить более высокий выход нуклеиновых кислот (8,1±3,8 нг/мкл против 2,82±0,9 нг/мкл). При этом концентрация ДНК в препаратах, полученных с применением набора «ДНК-Экстран-2», имела более стабильные показатели.

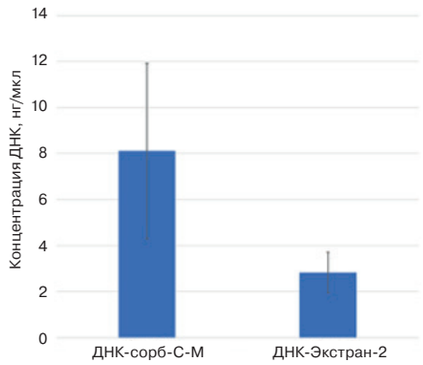

Рис. 1. Средние значения концентраций ДНК, выделенной из сырого коровьего молока (в качестве погрешностей указаны стандартные отклонения)

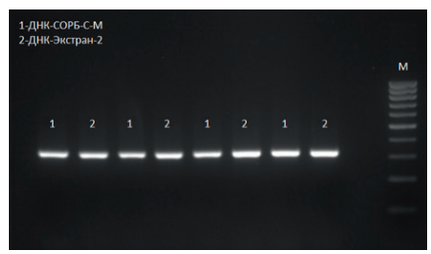

Рис. 2. Результаты ПЦР при использовании ДНК, выделенной из сырого молока наборами «ДНК-сорб-С-М» (1) и «ДНК-Экстран-2» (2): М – маркер длин ДНК 100–1000 п. н.

Для определения пригодности полученных препаратов ДНК для ПЦР проведена амплификация фрагмента митохондриальной ДНК коровы длиной 311 п. н. (рис. 2).

В обоих случаях получены продукты теоретически ожидаемой длины 311 п. н., соответствующие фрагменту митохондриального гена, кодирующего фермент цитохромоксидазу I коровы. Ингибирования ПЦР не наблюдалось. Можно предположить, что использованные методы выделения ДНК позволяют эффективно избавляться от потенциально ингибирующих веществ, входящих в состав молока.

Таким образом, с помощью наборов «ДНК-сорб-С-М» и «ДНК-Экстран-2» можно выделить ДНК из сырого молока. Качество и количество полученной с их помощью ДНК позволяет успешно проводить последующий молекулярно-генетический анализ безопасности и подлинности молока. Однако метод, основанный на использовании сорбента, обеспечивает более высокий выход ДНК, что может являться преимуществом при работе с редкими ДНК-мишенями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ***Пряничникова, Н. С.*** *Матрица маркеров, границы качества и срок годности молочных продуктов/Н. С. Пряничникова, С. А. Хуршудян// Пищевая промышленность. 2023. № 2. С. 49–51. DOI 10.52653/PPI. 2023.2.2.011*
2. ***Юрова, Е. А.*** *Нормирование показателей качества и идентификационных характеристик молока-сырья/Е. А. Юрова// Молочная промышленность. 2015. № 8. С. 26–28.*
3. ***Михайлова, И. Ю.*** *Влияние генетических факторов на продуктивность коров и качество молока/И. Ю. Михайлова [и др.]// Пищевая промышленность. 2021. № 1. С. 36–40. DOI 10.24411/0235-2486-2021-10007*
4. ***Bai, X.*** *Rapid and accurate detection for Listeria monocytogenes in milk using ampicillin-mediated magnetic separation coupled with quantitative real-time PCR/X. Bai [et al.]// Microchemical Journal. 2022. V. 183. P. 108063. https://doi.org/10.1016/j. microc. 2022.108063*
5. ***Kitpipit, T.*** *Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products/T. Kitpipit, K. Sittichan, P. Thanakiatkrai// Food Chemistry. 2014. V. 163. P. 77–82. DOI: 10.1016/j. foodchem. 2014.04.062*
6. ***Gupta, N.*** *DNA extraction and polymerase chain reaction/N. Gupta// Journal of cytology. 2019. V. 36. № 2. P. 116–117. DOI: 10.4103/JOC. JOC_110_18*
7. ***Sidstedt, M.*** *PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions/M. Sidstedt, P. Rådström, J. Hedman// Analytical and bioanalytical chemistry. 2020. V. 412. № 9. P. 2009–2023. DOI:10.1007/s00216-020-02490-2*
8. ***Powell, H. A.*** *Proteinase inhibition of the detection of Listeria monocytogenes in milk using the polymerase chain reaction/H. A. Powell [et al.]// Letters in Applied Microbiology. 1994. V. 18. № 1. P. 59–61. DOI: 10.1111/j.1472-765X. 1994. tb00802.x*
9. ***Bickley, J.*** *Polymerase chain reaction (PCR) detection of Listeria monocytogenes in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions/J. Bickley [et al.]// Letters in Applied Microbiology. 1996. V. 22. № 2. P. 153–158. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1996. tb01131.x*