

УДК 661.74

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Ю.В. Голубцова

ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности (университет)»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47

*e-mail: ahr@kemtipp.ru

Дата поступления в редакцию: 31.01.2017

Дата принятия в печать: 02.03.2017

Аннотация. Видовая идентификация свежего плодово-ягодного сырья занимает важное место в контроле качества готовых продуктов. В статье представлены результаты исследований, направленных на разработку метода видовой идентификации плодово-ягодного сырья с применением молекулярно-генетического анализа на примере: *Ribes uva-crispa* (крыжовник обыкновенный, сорт Кооператор), *Rosa majalis Herrm* (шиповник майский), *Prunus fruticose* (вишня степная, сорт Алтайская ласточка), *Actinidia deliciosa* (киви деликатесный). С использованием различных программных пакетов, а также базы данных GenBank NCBI для каждого из исследуемых объектов плодово-ягодного сырья на уровне родовой дифференциации удалось найти подходящий участок ДНК для дальнейшей разработки на его основе универсальных праймеров – участок 18S рДНК. Создана единая матрица выравнивания для каждого из исследуемых объектов плодово-ягодного сырья с помощью программы GeneDoc, проведена повторная проверка каждой матрицы на предмет наличия ошибок чтения или прочих спорных однонуклеотидных замен. Авторами проведен алгоритмический анализ последовательностей и поиск оптимальных позиций посадки праймеров с помощью программы PrimerQuest с указанием в настройках максимального размера ампликона, читаемого парой праймеров, не превышающего 300 п.н. Определены оптимальные параметры процесса амплификации: объем праймеров 0,5 мкл, режим амплификации: 95 °С, 60 с; 62 °С, 45 с; 72 °С, 30 с; 30 циклов. Выбранный режим амплификации подтвержден результатами проведения ПЦР со всеми образцами плодово-ягодного сырья с визуализацией в виде электрофореграммы в 1%-ном агарозном геле. Проведена дополнительная проверка специфичности праймеров с помощью алгоритма BLAST. Установлено, что все отсекуемые последовательности фрагментов, читаемых каждой из пар разработанных праймеров, полностью совпали с депонированными в GenBank последовательностями исследуемого вида сырья.

Ключевые слова. Плодово-ягодное сырье, видовая идентификация, растительное сырье, молекулярно-генетический анализ, секвенирование плодово-ягодного сырья

DESIGN OF SPECIFIC IDENTIFICATION METHOD OF FRUIT RAW MATERIAL BASED ON MOLECULAR GENETIC ANALYSIS

Yu.V. Golubtsova

Kemerovo Institute of Food Science
and Technology (University),
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia

*e-mail: ahr@kemtipp.ru

Received: 31.01.2017

Accepted: 02.03.2017

Annotation. Species identification of fresh fruit raw material plays an important role in the quality control of finished products. The article presents the results of research aimed at the design of species identification method of fruit raw material: *Ribes uva-crispa* (gooseberry of “The Cooperator” variety), *Rosa majalis Herrm* (*Rosa majalis*), *Prunus fruticose* (ground cherry of “The Altaiskaya Lastochka” variety), *Actinidia deliciosa* (kiwi delicacy) applying molecular genetic analysis. Using a variety of software packages, as well as GenBank NCBI database for each of the objects of fruit raw material at the level of generic differentiation we managed to find a suitable DNA segment for further development, on its basis, of universal primers - section 18S rDNA. A unified alignment matrix for each of the objects of fruit raw material with the help of GeneDoc program has been developed; recheck of each matrix for the presence of read errors or other controversial single nucleotide substitutions has been carried out. The authors have conducted an algorithmic sequence analysis and the search for optimum positions of primer setting using PrimerQuest program with the indication of the maximum size of the amplicon, readable by a primer pair not exceeding 300 bp. The optimum parameters of the amplification process are the following: primers’ volume of 0.5 l; amplification conditions: 95 °C, 60 seconds; 62 °C, 45 seconds; 72 °C, 30 seconds; 30 cycles have been determined. The selected amplification mode is confirmed by the results of PCR with all samples of fruit raw material with visualization in the form of electrophoregram in 1% gel. Additional investigation of primers’ specificity using the BLAST algorithm has been done. It has been found that all sequences of fragments readable with each of the pairs of primers designed coincide with deposited in Genbank sequences of investigated raw material.

Keywords. Fruit raw material, species identification, plant material, molecular genetic analysis, sequencing of fruit raw material

Введение

Постоянное совершенствование методов молекулярной биологии и накопление данных по составу генома плодово-ягодных растений [1, 2] способствовали появлению методов идентификации сырья растительного происхождения в продуктах питания, основанных на ДНК-технологиях с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод полимеразной цепной реакции позволяет из единичных клеток, содержащихся в анализируемом образце, получить необходимое количество ДНК для их идентификации [3–6]. Установление видовой принадлежности растительного сырья при помощи ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и возможностью количественного анализа. Кроме того, ДНК более устойчива в условиях технологического процесса, чем традиционно используемые низкомолекулярные маркеры [7, 8]. Учеными предложены многочисленные модификации по совершенствованию ПЦР [1, 9–12].

Несмотря на то, что использование метода ПЦР для видовой идентификации тканей растительного происхождения получило высокую оценку зарубежных специалистов, в нашей стране это направление не нашло широкого практического применения [13].

Использование коротких олигонуклеотидных праймеров позволяет проводить дифференциацию различных образцов плодово-ягодного сырья. Сложность заключается в том, что праймеры должны быть универсальными – одинаково эффективно амплифицировать фрагменты ДНК как из сырого материала, например свежих фруктов, так и из термообработанного, например повидла. Однако к настоящему моменту известно, что из термообработанного материала ожидаемый размер ампликона будет не более 270–300 пар нуклеотидов [14]. Следовательно, необходимо разработать праймеры, надежно амплифицирующие фрагмент длиной не более 300 п.н. Амплифицируемый фрагмент также должен содержать в себе определенное количество SNP (Single Nucleotide Polymorphism – единичные нуклеотидные замены), т.е. быть не полностью консервативным, – это позволит с большей вероятностью провести правильное определение объекта. При этом для «посадки» праймеров необходимо наличие консервативных участков ДНК.

В такого рода работах чаще других используют гены рДНК (РНК) – 18S, 5.8S и 26S, разделенные внутренними транскрибируемыми спейсерами ITS1 и ITS2 [15, 16]. Это обусловлено функциональной важностью данного участка генома, а также присутствием в нем эволюционно лабильных и консервативных областей в пределах одного повторяющегося участка, повсеместным присутствием во всех известных организмах, расширяющимся числом депонированных в GenBank последовательностей, используемых для сравнения [17].

Для дальнейшей работы было принято решение использовать участок малой субъединицы рибосомы – 18S рРНК, так как это наиболее часто используемый маркер в таксономических исследованиях и по нему есть большое количество информации.

Объекты и методы исследований

Теоретические и экспериментальные исследования выполнены на кафедре «Бионанотехнология» Федерального государственного бюджетного образования «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)».

Отдельные этапы работы выполнены в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», ГК № 14.740.11.1219 по теме: «Молекулярно-генетический анализ ДНК растительного происхождения с целью разработки ПЦР-тест-систем для идентификации фальсификации продуктов на их основе», соглашение № 4.В37.2.968.

В работе исследовано плодое сырье: *Ribes uva-crispa* (крыжовник обыкновенный, сорт Кооператор), *Rosa majalis Herrm* (шиповник майский), *Prunus fruticosae* (вишня степная, сорт Алтайская ласточка), *Actinidia deliciosa* (киви деликатесный).

Поиск нуклеотидных последовательностей геномов проводили по базам данных GenBank (Национальный институт здоровья, США).

Праймеры подобраны с использованием программы PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Компьютерная обработка, выравнивание последовательностей проведены в программах ClustalW и GeneDoc, построение филогенетических деревьев – в программе Mega 6.

Для дополнительной проверки специфичности праймеров было произведено секвенирование фрагментов, читаемых каждой из пар разработанных праймеров. Для этого было поставлено 8 ПЦР-реакций – по одной с каждой парой праймеров, соответствующих одному типу сырья. Полученные ПЦР-продукты переосадились этанолом в присутствии ацетата аммония, высушивались, а затем были отсеквенированы по Сэнгеру с помощью прибора ABI Prism 3500xl. Выходные данные секвенатора – хроматограммы – конвертировались в нуклеотидную последовательность, а затем с помощью алгоритма BLAST сравнивались с имеющимися в базе данных Genbank NCBI (Национальный институт здоровья, США) последовательностями.

Подобранные для проведения ПЦР видоспецифичные праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва). Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора реагентов «Сорб-ГМО» ЗАО «Синтол».

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены номера последовательностей NCBI видов плодово-ягодного сырья.

Использованные в работе номера NCBI изучаемых объектов в 18S рPHK

Род, к которому относятся изучаемые плоды и ягоды	Номера NCBI нуклеотидных последовательностей изучаемых видов плодово-ягодного сырья
<i>Ribes</i>	AY138019; AY138010; AY138005; AY137993; AY137980; AY137992; AY137977; AY138015; AY138020; AY138028; AY138030; AY138032; AY138033; AY138027; AY138026; AY138024; AY138023; AY138022; AY138021; AY138011; AY137989; AY137976; AY138010
<i>Rosa</i>	U90801; DQ242529; DQ242528; DQ242526; DQ242523; KP093154; KP093153; HM593928; HM593927; HM593926; HM593925; HM593924; HM593911; FM164424
<i>Prunus</i>	HQ332167; AF318729; KT887519; AF318717; AF318738; AF318721; AF318724; JQ926626
<i>Actinidia</i>	KC832314; KR819508; KR819507; KR819515; KX394612; KR819509; KR819510; KR819511; KR819512; KR819513; KR819514

Филогенетический анализ, проведенный на основе нуклеотидных последовательностей 18S рPHK изучаемого плодово-ягодного сырья, показывает родственные связи видов плодовых растений внутри одного рода. Например, род *Prunus* включает различные виды плодово-ягодного сырья – вишню, сливу, персик, абрикос, черемуху и др., что необходимо учитывать в экспериментальных исследованиях и практической работе по видовой идентификации сырья. С одной стороны, разработанные праймеры на основе выбранных нуклеотидных последовательностей можно использовать для идентификации всех представленных видов внутри родов, с другой – необходимо помнить, что при вза-

имном присутствии плодово-ягодного сырья, относящегося к одному роду, их идентифицировать будет невозможно.

На следующем этапе исследований в программе GeneDок ранее проведенные выравнивания были визуализированы и отредактированы. Таким образом, была создана единая матрица выравнивания для каждого из исследуемых объектов. Матрицы приведены на рис. 1–4. Далее проводили повторную проверку каждой матрицы на предмет наличия ошибок чтения или прочих спорных однонуклеотидных замен.

Матрицы были выровнены с двух сторон выравнивания. Наличие выступающих «хвостов» может помешать дальнейшей работе программ.

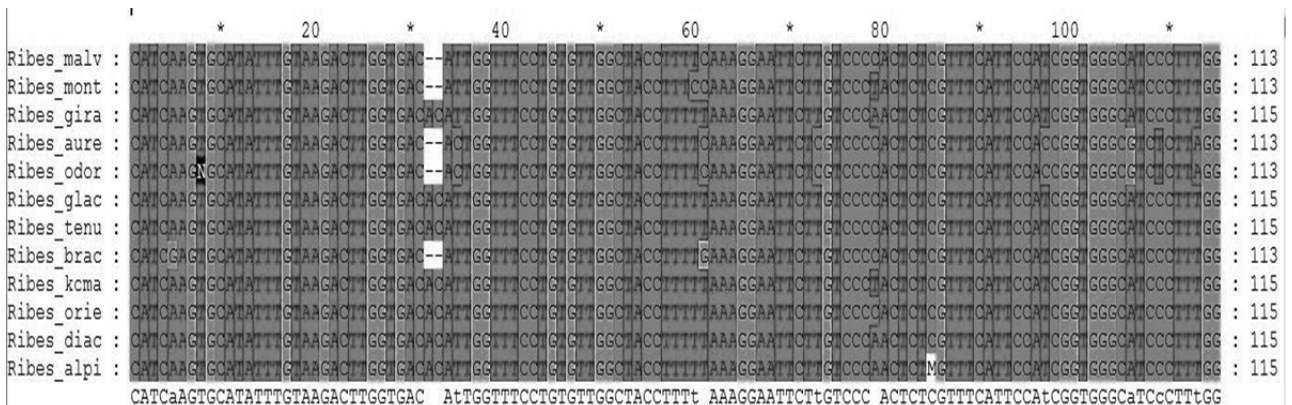


Рис. 1. Часть матрицы выравнивания нуклеотидных последовательностей *Ribes úva-crispa*

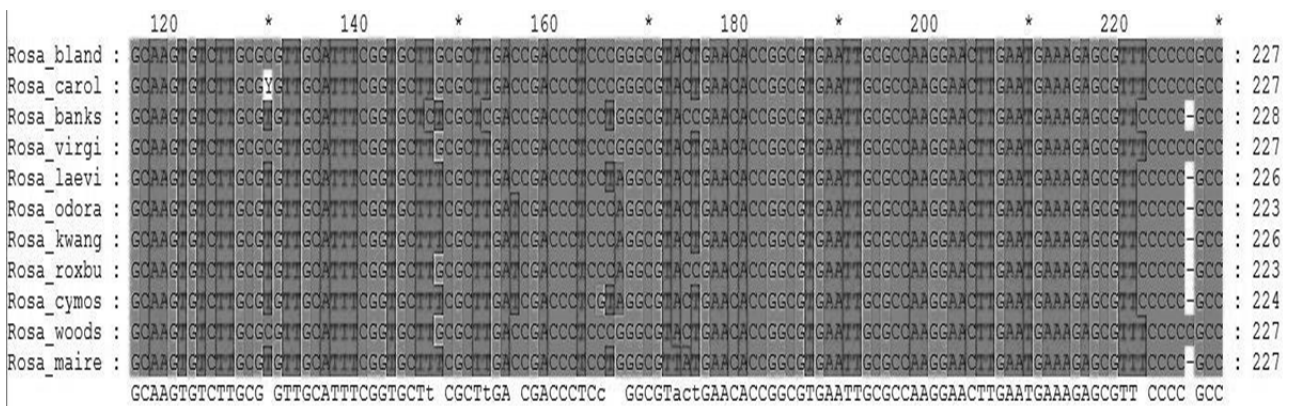
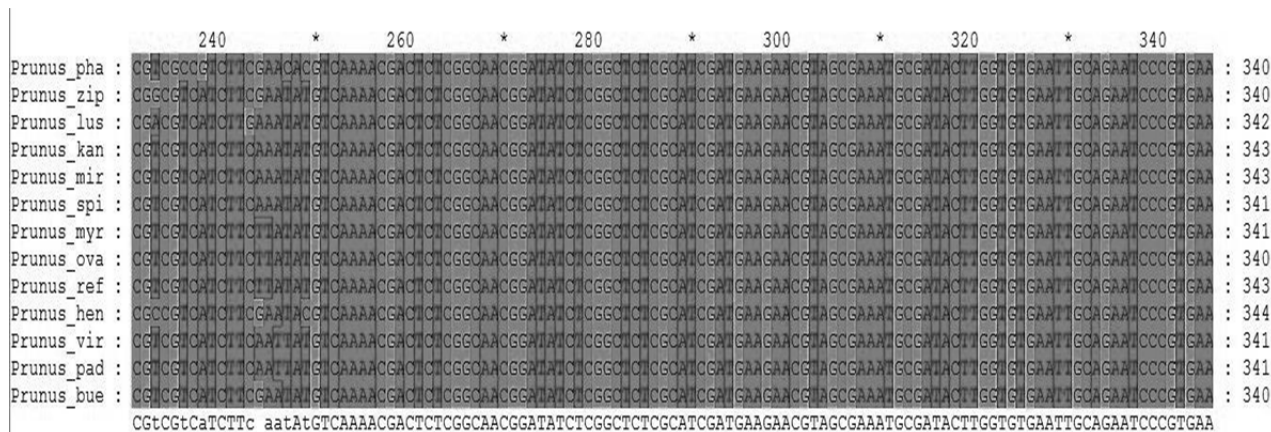
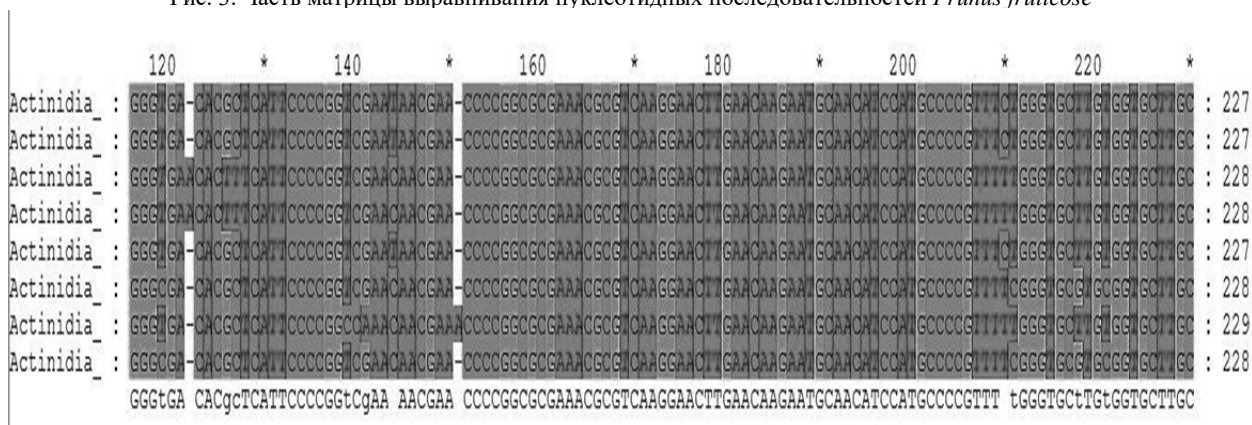


Рис. 2. Часть матрицы выравнивания нуклеотидных последовательностей *Rosa majalis Herrm*

Рис. 3. Часть матрицы выравнивания нуклеотидных последовательностей *Prunus fruticose*Рис. 4. Часть матрицы выравнивания нуклеотидных последовательностей *Actinidia deliciosa*

Таким образом, были получены прямоугольные матрицы выравнивания для каждого из исследуемых объектов.

Далее каждая матрица загружалась в программу PrimerQuest для алгоритмического анализа последовательностей и поиска оптимальных позиций посадки праймеров.

В настройках обязательно указывалось, что максимальный размер ампликона, читаемого парой

праймеров, не должен превышать 300 п.н. Из предложенных программой вариантов праймеров выбиралась оптимальная пара. Учитывались такие параметры, как длина праймера, температура отжига, расположение ампликона. Выбранные универсальные непересекающиеся праймеры для определения методом ПЦР плодово-ягодного сырья (земляники, крыжовника, вишни, малины, банана, шиповника, киви) представлены в табл. 2.

Таблица 2

Универсальные праймеры для тест-систем ПЦР

Наименование сырья	Длина праймера, п.н.	Длина ампликона, п.н.	Праймеры
<i>Ribes uva-crispa</i>	22 23	269	CGTCTGCTCATATGTCCATCAA GGAGCAATAAAGCACCACATAC
<i>Prunus fruticose</i>	22 23	285	CTTGGTGTGAATTGCAGAAATCC CATCTTACTTCTAGCCCTCGAC
<i>Rosa majalis</i>	20 21	227	GTTTCCTGTGTTGGTACCT TGGGCAGATGGAGCAATAAA
<i>Actinidia deliciosa</i>	21 22	283	GACCCGCGAACTTGTCTAATA GCATTCGCTACGTCTTCATC

Известно, что на проведение ПЦР влияют такие параметры, как концентрация праймеров, температура отжига, температура денатурации и количество циклов амплификации.

Все праймеры были разработаны с помощью программы PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Для упрощения дальнейшей работы программы в установочных настройках

было рекомендовано создать праймеры с одинаковой температурой отжига, что и было сделано.

Однако необходимо было также выявить оптимальные параметры амплификации, которые будут использованы в дальнейшем. Так как температура отжига праймеров известна (62 °C), под знаком вопроса остается лишь количество циклов, а также время элонгации ПЦР.

Размер ампликонов, получаемых с помощью разработанных праймеров, колеблется от 230 до 300 нуклеотидов. Исходя из этого, рекомендуемое время элонгации во время ПЦР составляет 30 секунд.

Для выбора оптимального количества циклов амплификации был проведен эксперимент по схеме, представленной в табл. 3. В процессе эксперимента варьировались такие параметры, как количество циклов ПЦР реакции, а также время элонгации.

Анализ показал, что оптимальными параметрами амплификации являются значения II варианта опыта (табл. 3). Лимитирующим фактором при ра-

боте с данными праймерами является количество циклов реакции. Изменение времени элонгации не сопровождается изменениями других параметров реакции, изменение температуры отжига не рекомендуется: при понижении температуры в реакции будет образовываться множество неспецифических продуктов амплификации, при повышении – амплификации искомым фрагментов не произойдет.

После проведения ПЦР со всеми праймерами и типами сырья полученные продукты были визуализированы с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Анализ показал, что реакция прошла успешно со всеми исследуемыми образцами плодово-ягодного сырья.

Таблица 3

Схема проведения исследования по определению оптимальных параметров амплификации

Параметры	Варианты опыта					
	I		II		III	
Объем праймеров, мкл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Режим амплификации	95 °C, 60 с 62 °C, 30 с 72 °C, 30 с 25 циклов		95 °C, 60 с 62 °C, 45 с 72 °C, 30 с 30 циклов		95 °C, 60 с 62 °C, 30 с 72 °C, 30 с 40 циклов	

Для дополнительной проверки специфичности праймеров было произведено секвенирование фрагментов, читаемых каждой из пар разработанных праймеров. Для этого было поставлено 8 ПЦР-реакций – по одной с каждой парой праймеров, соответствующих одному типу сырья. Полученные ПЦР-продукты пересаживались этанолом в присут-

ствии ацетата аммония, высушивались, а затем были отсеквенированы по Сэнгеру с помощью прибора ABI Prism 3500xl. Выходные данные секвенатора – хроматограммы (рис. 5) конвертировались в нуклеотидную последовательность, а затем с помощью алгоритма BLAST сравнивались с имеющимися в GenBank NCBI последовательностями.

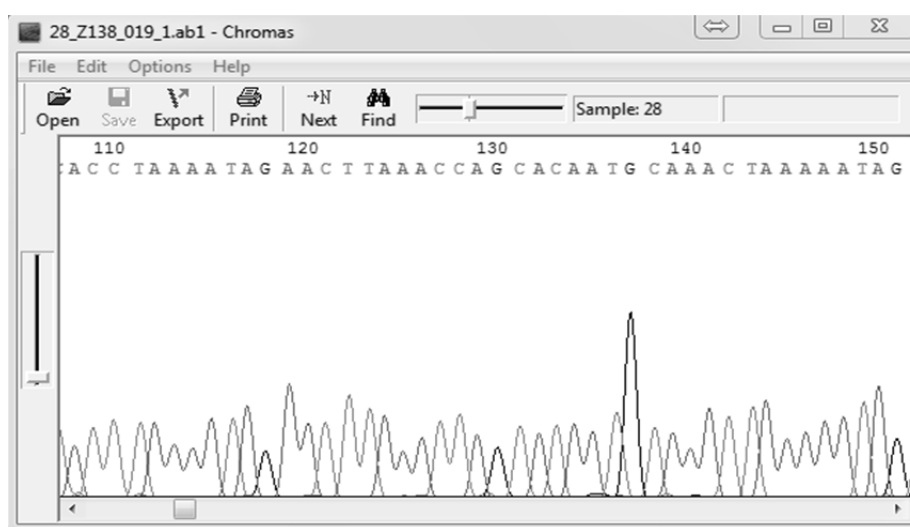


Рис. 5. Графический вывод секвенатора ABI Prism – хроматограмма

Все отсеквенированные последовательности совпали с задепонированными в GenBank последовательностями каждого вида сырья.

Таким образом, с использованием различных программных пакетов, а также базы данных GenBank NCBI для каждого из исследуемых объектов

плодово-ягодного сырья на уровне родовой дифференциации удалось найти подходящий участок ДНК для дальнейшей разработки на его основе универсальных праймеров – это участок 18S рДНК.

Все найденные последовательности имеют как консервативную часть – для посадки пары прайме-

ров, так и изменчивую – для достоверного определения видов или проведения филогенетического анализа. Создана единая матрица выравнивания для каждого из исследуемых объектов плодово-ягодного сырья с помощью программы GeneDoc, проведена повторная проверка каждой матрицы на предмет наличия ошибок чтения или прочих спорных одонуклеотидных замен.

Проведен алгоритмический анализ последовательностей и поиск оптимальных позиций посадки праймеров с помощью программы PrimerQuest с указанием в настройках максимального размера ампликона, читаемого парой праймеров, не превышающего 300 п.н.

Из предложенных программой вариантов праймеров выбраны оптимальные пары для каждого вида плодово-ягодного сырья с учетом таких параметров, как длина праймера, температура отжига, расположение ампликона.

Определены оптимальные параметры процесса

амплификации: объем праймеров 0,5 мкл, режим амплификации: 95 °С, 60 с; 62 °С, 45 с; 72 °С, 30 с; 30 циклов. Выбранный режим амплификации подтвержден результатами проведения ПЦР со всеми образцами плодово-ягодного сырья с визуализацией в виде электрофореграммы в 1%-ном агарозном геле.

Проведена дополнительная проверка специфичности праймеров с помощью алгоритма BLAST. Установлено, что все отсекуенные последовательности фрагментов, читаемых каждой из пар разработанных праймеров, полностью совпали с задепонированными в GenBank последовательностями исследуемого вида сырья.

Дальнейшие исследования будут направлены на проверку жизнеспособности разработанного метода на примере объектов, содержащих термообработанное плодово-ягодное сырье, – в частности, молочные продукты с добавлением крыжовника, шиповника, вишни и киви.

Список литературы

1. Урбанович, О.Ю. Молекулярные методы в селекции яблони на устойчивость к красногалловой яблони / О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, А.А. Хацкевич, Н.А. Картель // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 5. – С. 54–60.
2. Малышев, С.В. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров: методические рекомендации / С.В. Малышев, О.Ю. Урбанович, Н.А. Картель. – Минск, 2006. – 28 с.
3. Galkin, A.Yu. Development of quality control methods and analysis of herbal preparation for treatment and prevention of alopecia / A. Yu. Galk, A.G. Kotov // Украинский журнал лабораторной медицины. 2011. – Vol. 6. – No 2. – P. 115–119.
4. Negi, M.S. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides* / M.S. Negi, J. Rajagopal, N. Chauhan et al. // Genome. – 2002. – Vol. 45. – No. 6. – P. 1181–1188.
5. Методы ДНК-технологии для идентификации растительного сырья в молочных продуктах / А.Ю. Просеков, О.В. Мудрикова, А.В. Булавина, А.Н. Архипов // Молочная промышленность. – 2011. – № 12. – С. 62–63.
6. Lisitsyn, A. Research of methods of identification and quantitative content of prion protein in blood of animals and man / A. Lisitsyn, A. Prosekov, O. Kriger // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – Vol. 7. – No. 2. – P. 1723–1728.
7. Lees M. (eds.) Food Authenticity and Traceability. CRC Press: Cambridge U.K. – 2003. – 612 p.
8. Конструирование родоспецифичных и видоспецифичных праймеров для индикации и идентификации *Lactobacillus bulgaricus* / К.В. Беспоместных, О.О. Бабич, Е.В. Короткая, А.Ю. Просеков // Техника и технология пищевых производств. – 2010. – Т. 16. – № 1. – С. 64–68.
9. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов [и др.]; под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.
10. PCR Protocol Optimization for Genetic Diversity Assessment and Molecular Characterization of Sour Cherry Cultivars / I.V. Berindean, E. Cardei, G. Roman, M. Sturzeanu, D. Pamfil // Bulletin UASVM Horticulture. – 2012. – Vol. 69. – No. 1. – P. 71–80.
11. Юдин, М.С. Исследование методов Полимеразной цепной реакции для определения сырьевых компонентов в готовых продуктах / М.С. Юдин, К.Ю. Зубарева // Международный журнал экспериментального образования. – 2010. – № 8. – С. 77–79.
12. Боронникова, С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редкого вида растений Пермского края *Adenophora Lilifolia* (L.) A. DC. / С.В. Боронникова, Ю.С. Нечаева // Вестник Пермского университета. Серия: биология. – 2012. – Вып. 1. – С. 41–44.
13. Prosekov, A.Yu. Theory and practice of prion protein analysis in food products / A.Yu. Prosekov // Foods and Raw Materials. – 2014. – Vol. 2. – No. 2. – P. 106–120.
14. Просеков, А.Ю. Современные методы исследования сырья и биотехнологической продукции / А.Ю. Просеков, О.О. Бабич, С.А. Сухих. – Кемерово, 2013. – 183 с.
15. Moskvina, N.A. Primenenie metoda polimeraznoj cepnoj reakcii dlya vidovoj identifikacii produktov pererabotki rastitel'nogo syr'ya / N.A. Moskvina, Yu.V. Golubcova, O.V. Kriger // Tekhnika i tekhnologiya pishchevyh proizvodstv. – 2014. – No. 2. – P. 126–129.
16. Бадаева, Е.Д. Структура генома и хромосомный анализ растений / Е.Д. Бадаева, Е.А. Салина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – № 4–2. – С. 1017–1043.
17. Сравнительный анализ первичной структуры гена 18s рРНК представителей разных экобиоморф рода *Veronica* l. (Scrophulariaceae) / В.А. Пантюхина, Д.В. Новиков, Н.П. Савиных, В.В. Новиков // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – № 2–3. – С. 169–173.

References

1. Urbanovich O.Yu., Kozlovskaya Z.A., Khatskevich A.A., Kartel' N.A. Molekulyarnye metody v selektsii yabloni na ustoychivost' k krasnogallovoy yabloni [Molecular methods in apple breeding for resistance to rosy leaf-curling aphid]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2013, no. 5, pp. 54–60.
2. Malyshev S.V., Urbanovich O.Yu., Kartel' N.A. *Identifikatsiya i pasportizatsiya sortov sel'skokhozyaystvennykh kul'tur (myagkoy pshenitsy, kartofelya, tomata, l'na i svekly) na osnove DNK-markerov: metod. Rekomendatsii* [The identification and passportisation of varieties of crops (of soft wheat, of potato, of tomato, of flax and beet) on the basis of DNA markers: methodological recommendations]. Minsk, 2006. 28 p.
3. Galkin A.Yu., Kotov A.G. Development of quality control methods and analysis of herbal preparation for treatment and prevention of alopecia. *Ukrainskiy zhurnal laboratornoy meditsiny* [Ukrainian magazine of laboratory medicine], 2011, vol. 6, no. 2, pp. 115–119.
4. Negi M.S., Rajagopal J., Chauhan N. et al. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoids*. *Genome*, 2002, vol. 45, no. 6, pp. 1181–1188.
5. Prosekov A.Yu., Mudrikova O.V., Bulavina A.V., Arkhipov A.N. Metody DNK-tehnologii dlya identifikatsii rastitel'nogo syr'ya v molochnykh produktakh [DNA technology methods for the identification of plant raw dairy products]. *Molochnaya promyshlennost'* [Dairy industry], 2011, no. 12, pp. 62–63.
6. Lisitsyn A., Prosekov A., Kriger O. Research of methods of identification and quantitative content of prion protein in blood of animals and man. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2016, vol. 7, no. 2, pp. 1723–1728.
7. Lees M. (eds.) *Food Authenticity and Traceability*. CRC Press: Cambridge U.K., 2003. 612 p.
8. Bospomestnykh K.V., Babich O.O., Korotkaya E.V., Prosekov A.Yu. Konstruirovaniye rodospetsifichnykh i vidospetsifichnykh praymerov dlya indikatsii i identifikatsii *Lactobacillus bulgaricus* [Design of genus-specific and species-specific primers for indication and identification of *Lactobacillus bulgaricus*]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv* [Food Processing: Techniques and Technology], 2010, vol. 16, no. 1, pp. 64–68.
9. Rebrikov D.V. (ed.), Samatov G.A., Trofimov D.Yu. et al. *PTsR «v real'nom vremeni»* [PCR "in real time"]. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2009. 215 p.
10. Berindean I.V., Cardei E., Roman G., Sturzeanu M., Pamfil D. PCR Protocol Optimization for Genetic Diversity Assessment and Molecular Characterization of Sour Cherry Cultivars. *Bulletin UASVM Horticulture*, 2012, vol. 69, no. 1, pp. 71–80.
11. Yudin M.S., Zubareva K.Yu. Issledovanie metodov polimeraznoy tsepnoy reaktsii dlya opredeleniya syr'evykh komponentov v gotovykh produktakh [Research by method of polymerase chain reaction to determine the raw material components in the finished products]. *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya* [International journal of experimental education], 2010, no. 8, pp. 77–79.
12. Boronnikova S.V., Nechaeva Yu.S. Molekulyarno-geneticheskaya identifikatsiya i pasportizatsiya redkogo vida rasteniy Permskogo kraya *Adenophora Lilifolia* (L.) A. DC. [The molecular-genetic identification and certification of rare species of plants of Perm kraia *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC.]. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: biologiya* [Bulletin of Perm University. Biology], 2012, iss. 1, pp. 41–44.
13. Prosekov A.Yu. Theory and practice of prion protein analysis in food products. *Foods and Raw Materials*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 106–120.
14. Prosekov A.Yu., Babich O.O., Sukhikh S.A. *Sovremennyye metody issledovaniya syr'ya i biotekhnologicheskoy produktsii* [Modern methods of research of raw materials and biotechnology products]. Kemerovo: KemIFST Publ., 2013. 183 p.
15. Moskvina N.A., Golubcova Yu.V., Kriger O.V. Primenenie metoda polimeraznoy tsepnoy reaktsii dlya vidovoy identifikatsii produktov pererabotki rastitel'nogo syr'ya [Application of polymerase chain reaction method for specific identification of foods of plant raw material processing]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv* [Food Processing: Techniques and Technology], 2014, no. 2, pp. 126–129.
16. Badaeva E.D., Salina E.A. Struktura genoma i khromosomnyy analiz rasteniy [Genome structure and chromosome analysis in plants]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov Journal of Genetics and Breeding], 2013, no. 4-2, p. 1017–1043.
17. Pantyukhina V.A., Novikov D.V., Savinykh N.P., Novikov V.V. Cravnitel'nyy analiz pervichnoy struktury gena 18S rRNK predstaviteley raznykh ekobiomorf roda *Veronica* L. (Scrophulariaceae) [A comparative analysis of the primary structure of the 18S rRNA gene of different ecobiomorph representatives of the genus *Veronica* L. (Scrophulariaceae)]. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* [Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod], 2012, no. 2-3, pp. 169–173.

Дополнительная информация / Additional Information

Голубцова, Ю.В. Разработка метода видовой идентификации плодово-ягодного сырья на основе молекулярно-генетического анализа / Ю.В. Голубцова // Техника и технология пищевых производств. – 2017. – Т. 44. – № 1. – С. 111–117.

Golubtsova Yu.V. Design of specific identification method of fruit raw material based on molecular genetic analysis. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2017, vol. 44, no. 1, pp. 111–117 (In Russ.).

Голубцова Юлия Владимировна

канд. техн. наук, и. о. проректора по развитию имущественного комплекса, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, тел.: +7 (3842) 39-68-57, e-mail: ahr@kemtipp.ru

Yulia V. Golubtsova

Cand.Sci.(Eng.), Acting Vice-rector for Property Complex Development, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-57, e-mail: ahr@kemtipp.ru