

На правах рукописи



ХАН АЛЕКСЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА
ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК *BOS TAURUS* В МОЛОКЕ И
МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ**

4.3.3 – Пищевые системы

4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва, 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Научный руководитель: **Фоменко Олег Юрьевич**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Симоненко Сергей Владимирович**
доктор технических наук, директор Научно-исследовательского института детского питания – филиала ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии»

Гладырь Елена Александровна
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики сельскохозяйственных животных, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет»

Защита состоится «19» июня 2025 г. в 10 часов 00 минут на заседании объединенного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 99.0.092.02 при ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» по адресу 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11, корп. А, Зал А-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». Полный текст диссертации размещен в сети Интернет на официальном сайте ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» <http://www.mgupp.ru>.

С авторефератом можно ознакомиться на официальных сайтах ВАК Минобрнауки РФ (<http://vak.ed.gov.ru>) и ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» (<http://www.mgupp.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года.

Ученый секретарь
диссертационного совета 99.0.092.02,
кандидат технических наук, доцент



Ю.В. Николаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Обеспечение населения безопасными и качественными пищевыми продуктами является приоритетным направлением государственной политики, согласно Стратегии научно-технологического развития от 28.02.2024 № 145 и Доктрине продовольственной безопасности Российской Федерации от 21 января 2020 г. № 20. Востребованность продукции из козьего молока среди населения обусловлена высокой питательной ценностью, противовоспалительным, противомикробным действием и т.п. Однако при производстве данного вида продуктов распространена практика подмены молока мелких жвачных коровьим молоком, что чревато нанесением непоправимого вреда здоровью уязвимым группам лиц с аллергическими реакциями на молочные белки, содержащиеся в данном сырье.

Процесс недобросовестной подмены козьего молока вызван рядом факторов: дисбаланс спроса и предложения, снижение себестоимости, сезонность данного молочного производства и др. Одним из передовых направлений идентификации видов молока является применение надежных и экспрессных молекулярно-генетических методов, обладающих высоким потенциалом для анализа многокомпонентных пищевых матриц.

Следует отметить, что данные методы обладают рядом преимуществ перед традиционными методами анализа, такими как хроматографические, иммунологические, спектрометрические и др., которые не всегда применимы в виду возможной денатурации и нестабильности целевых аналитов (белков и липидов), возникающих в процессе технологической обработки молочных продуктов.

Значимость и способы решения проблемы обеспечения продовольственной и биологической безопасности изложены в Федеральном законе № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации» от 30 декабря 2020 г. и Стратегии повышения качества пищевой продукции в РФ до 2030 года (утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 29 июня 2016 г. № 1364-р).

К настоящему времени проблема идентификации фальсифицированных молочных продуктов остается актуальной в пищевой промышленности, поскольку на российском рынке отсутствуют коммерческие наборы (тест-системы), определяющие видовую принадлежность молочных продуктов. В связи с вышеизложенным, данная научно-исследовательская работа является важным шагом в изучении проблемы аутентификации продукции из козьего молока.

Степень разработанности темы исследований. Исследованиям фальсификации, идентификации и контроля качества пищевых продуктов посвящены научно-исследовательские работы отечественных и зарубежных учёных: академик РАН Галстян А. Г., Дунченко Н. И., Жижин Н. А., академик РАН Оганесянц Л. А., академик РАН Петров А. Н., Цыганова Т. Б., академик РАН Чернуха И. М., Юрова Е. А., Azad T., Deng L., Di Domenico M. и др.

Целью работы является разработка метода выявления ДНК *B. taurus* при идентификации видового происхождения молока и молочной продукции методом ПЦР-РВ.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и последовательно реализованы следующие **задачи**:

1. Рассмотреть и систематизировать теоретические аспекты вопросов видовой идентификации молока и молочных продуктов и молекулярно-генетических способов выявления фактов фальсификации в молочной промышленности;
2. Провести сравнительный анализ пригодности коммерческих наборов реагентов для экстракции ДНК из козьего молока и продуктов его переработки и возможности использования получаемых препаратов нуклеиновых кислот для последующих ПЦР-исследований;
3. Провести биоинформатический анализ видоспецифичных последовательностей ДНК, пригодных для использования в виде генных мишеней при оценке присутствия чужеродных геномов в продуктах из козьего молока;
4. Разработать молекулярно-генетический метод на основе мультиплексной ПЦР-РВ для выявления ДНК *Bos taurus* в молочных продуктах и определить его ключевые метрологические характеристики;
5. Разработать стандартизированную методику количественного определения ДНК домашнего быка в молочных продуктах;
6. Выполнить молекулярно-генетическое тестирование образцов молочной продукции из козьего молока, выработанных промышленным способом.

Научная новизна:

- получены новые знания об использовании постгеномных технологий для мониторинга и контроля качества молочного сырья, подтверждения состава и обеспечения биологической безопасности козьего молока и продуктов его переработки;

- сконструированы видоспецифические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды для проведения молекулярно-генетического анализа;

- показана возможность эффективной амплификации фрагментов ДНК домашнего быка, выделенной из молочной продукции, в диапазоне от 0,001 нг до 10 нг на реакцию.

Практическая значимость:

- расширены и экспериментально подтверждены критерии контроля качества козьего молока и продуктов на его основе с применением современных молекулярно-генетических подходов;

- разработан молекулярно-генетический метод, позволяющий идентифицировать видовое происхождение молочной продукции на основе амплификации специфических фрагментов мтДНК *Bos taurus*;

- разработан и утвержден СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

Методология и методы исследований.

В диссертационной работе применялись современные общепринятые и разработанные во ФГАНУ «ВНИМИ» молекулярно-генетические методы, применяемые в области контроля качества молочной продукции.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Набор олигонуклеотидных праймеров и гидролизуемых зондов для целевой амплификации видоспецифических локусов мтДНК *Bos taurus*.

2. Комплект реактивов для одновременной идентификации ДНК домашнего быка и внутреннего положительного контроля.

3. Методика идентификации и количественного определения генома *B. taurus* в козьем молоке-сырье и продуктах на его основе.

Степень достоверности и апробация работы.

Исследования проводились в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Работа была выполнена на аттестованном аналитическом оборудовании, включенном в Реестр средств измерений и прошедшем поверку.

Основные положения и результаты работы доложены и одобрены на следующих конференциях: Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики», посвященная 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова (Санкт-Петербург, 2023), XI Всероссийская (национальная) научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2023), Научно-практическая конференция «Вопросы производства сыра, масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения» (Углич, 2023), XXIII Международная конференция по науке и технологиям Россия-Корея-СНГ (Москва, 2023), 4 Международная научно-практическая конференция (Краснодар, 2024). Результаты работы отмечены дипломом III степени ФГАНУ НИИХП в рамках VI Международной научно-практической молодежной конференции (Москва, 2024), дипломом ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН в номинации «Лучший стендовый доклад» в рамках XVII Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов (Москва, 2024).

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Непосредственный вклад автора состоит в рассмотрении источников научной литературы, разработке дизайна теоретических и экспериментальных исследований, постановке целей и ключевых задач, проведении исследований, обсуждении полученных результатов и формулировании итоговых выводов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует пунктам 5, 17 паспорта научной специализации 4.3.3 «Пищевые системы» (технические науки), пунктам 12, 27 паспорта научной специализации 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» (технические науки).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе: 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 9 статей в сборниках трудов конференций и журналах РИНЦ.

Структура и объем работы. Рукопись диссертации включает в себя введение, литературный обзор, методическую часть, результаты собственных исследований и их анализ, выводы, а также список использованных источников литературы и приложения. Основной текст работы изложен на 156 страницах, содержит 24 таблицы, 68 рисунков, 222 использованных литературных источников, из которых 149 на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, определена научная новизна и практическая значимость полученных результатов, предоставлена информация о проведенных испытаниях и научных публикациях.

В главе 1 представлены общие и сравнительные видовые характеристики молока крупного и мелкого рогатого скота, современные тенденции и перспективы развития мирового и российского рынков молочной продукции, приведены сведения о видах фальсификации молочной продукции и вызываемых ею рисках для здоровья, дан обзор существующих методов выявления различных примесей и подмены молока разных видов жвачных животных.

В главе 2 изложена методология, структура, организация и схема проведения теоретических и экспериментальных исследований (рисунок 1).

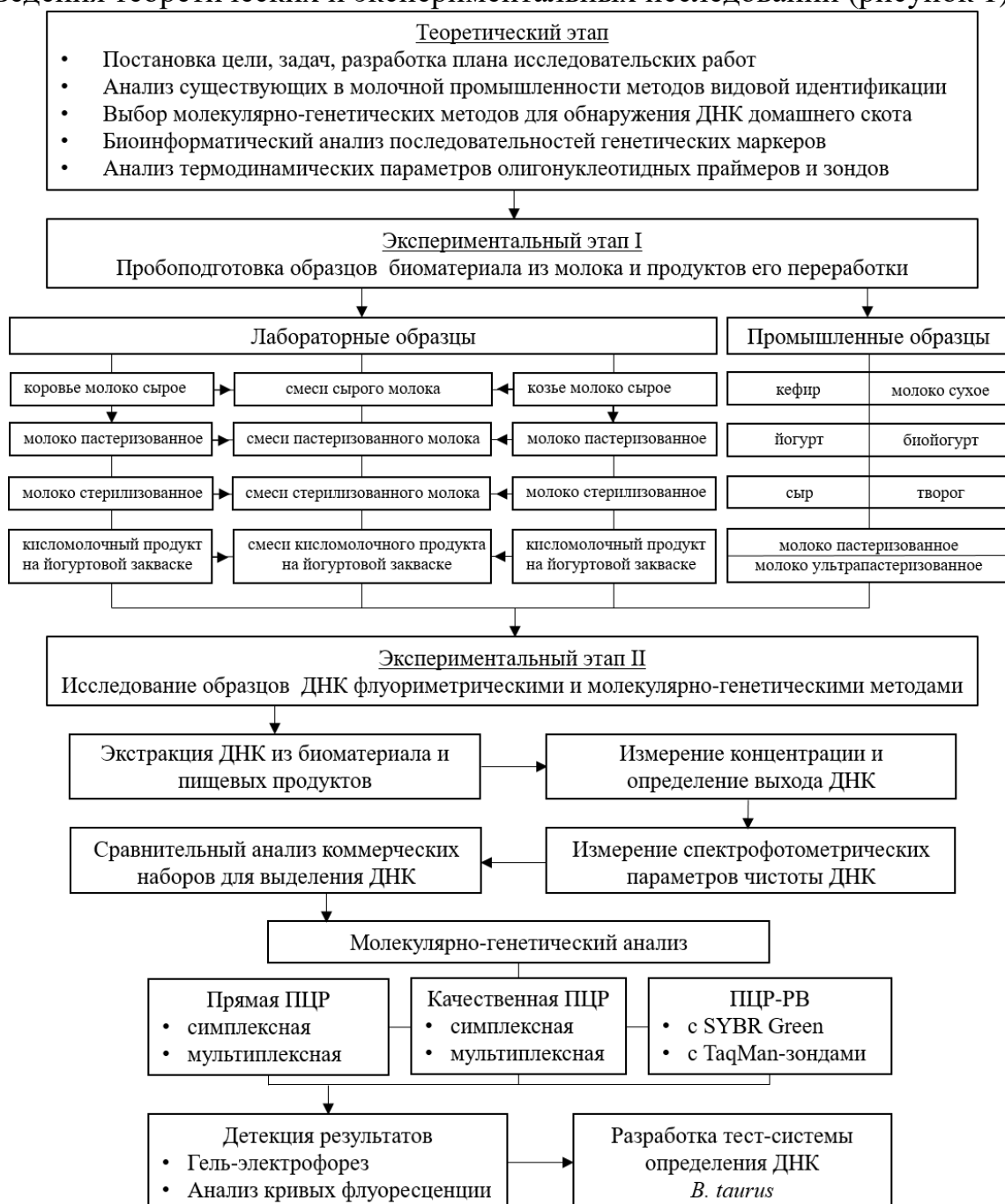


Рисунок 1 – Общая схема проведенных исследований

В качестве объектов исследования использовались молоко сырое коровье, молоко сырое козье и приготовленные на их основе бинарные молочные смеси, а также полученные из них продукты (молоко пастеризованное, стерилизованное, кисломолочные продукты на йогуртовой закваске). Помимо этого, проводили анализ промышленных молочных продуктов (молока пастеризованного, ультрапастеризованного, сухого цельного (СЦМ), йогурта, биойогурта, сыра, творога и кефира). Выделение ДНК из образцов молочной продукции проводилось с помощью коммерчески доступных наборов реагентов: «ДНК-Сорб-С-М» (№1) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) «ДНК-Экстран-2» (№2) (ООО «НПФ Синтол», Россия), «Сорб-ГМО-Б» (№3) (ООО «НПФ Синтол», Россия), «ГМО-МагноСорб» (№4) (ООО «НПФ Синтол», Россия) и «К-Сорб» (№5) (ООО «НПФ Синтол», Россия).

Пробоподготовка жидких образцов происходила следующим образом: пробы молочных продуктов объемом 2 мл центрифугировали при 10 000 g в течении 5 минут, после чего супернатант удаляли с использованием вакуумного отсасывателя. Полученный осадок использовали для экстракции ДНК. Пробоподготовка твердых образцов (сыры) включала центрифугирование пробы массой 400 мг с последующим удалением надосадочной жидкости. Пробоподготовка сухих образцов (СЦМ) включала использование 100 мг сухого вещества для последующего извлечения ДНК.

Измерение концентрации образцов ДНК было проведено на флуориметре Qubit 4 («Invitrogen», США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA BR Assay Kit («Invitrogen», США). Объем исследуемой пробы составлял 5 мкл. Оценка чистоты ДНК в данной работе была проведена с помощью микроспектрофотометра Nano-500 («Allsheng», США) в объеме 2 мкл.

Аналитический электрофорез проводился при напряжении электрического поля 7 В/см геля в течение 1 часа с применением маркеров длин ДНК «1 kb DNA Ladder» и «100+ bp DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия) в 1-2% агарозном геле (VWR International LLC, США), предварительно окрашенном раствором бромистого этидия. Документирование осуществляли с использованием системы гель-документирования «Vilber E-Box-CX5.TS» (Vilber, Франция) на трансиллюминаторе «Vilber Super-Bright» (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

Тестирование молочных матриц проводили методом ПЦР с использованием праймеров, комплементарных фрагментам ДНК *B. taurus*, *C. hircus* и вектора pAL2-T. Амплификация методами качественной симплексной и дуплексной ПЦР проводилась с использованием пар праймеров, воды (ЗАО «Евроген», Россия), окрашенной реакционной смеси 5X ScreenMix (ЗАО «Евроген», Россия) и образцов ДНК на приборе MiniAmp («ThermoFisher Scientific», США). ПЦР-РВ анализ проводился с использованием праймеров и раствора реакционной смеси с интеркалирующим красителем «5X qPCRmix-HS SYBR» (ЗАО «Евроген», Россия).

Мультиплексная ПЦР-РВ проводилась в присутствии олигонуклеотидных праймеров, гидролизующих флуоресцентно меченных зондов и микса «5X qPCRmix-HS» (ЗАО «Евроген», Россия), в амплификаторах LightCycler 96 («Roche», Швейцария) и Rotor-Gene Q («QIAGEN», Германия). Последовательности олигонуклеотидов приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры и зонды, использованные в работе

Название	Последовательность	T _a , °C	Мишень	Длина ампликона, п.н.	Источник
BT-F	ACCCTCTCGACTAAACAACCAAGATAG	57	16S pPHK <i>B. taurus</i>	583	Deng <i>et al.</i> , 2020
BT-R	TGGGGCTAGGAGTTAATCATTTGTTG				
CH-F	ACTCCACAAGCTTACAGACATGCCA	57	D-петля <i>C. hircus</i>	184	
CH-R	GAAGGCTGTATGTCCGCGTTATATG				
16_BT_for	CCTCTCGACTAAACAACCAAGAT	62	16S pPHK <i>B. taurus</i>	111	данная работа
16_BT_rev	GTTCCTTGCGGTACTTTCT				
16_BT_probe	/HEX/- AGGAGATAGAAATCTAAGTACGGCGCT-/BHQ-2/				
D_CH_for	GCCAACAACCCACACGTATAA				
D_CH_rev	TAGGCGAGCGGTGTAATGTA	62	D-петля <i>C. hircus</i>	114	
D_CH_probe	/FAM/- CACACAAACGCCAACACCACACAA-/BHQ-1/				
vko_P_for	GCGGATAACAATTTACACAGG	62	<i>Plac</i> pAL2-T	94	
vko_P_rev	CGTTGGATGCATAGCTTGAGTA				
vko_P_probe	Cy5/AGCTATGACCATGATTACGCCAAGCT/BHQ2				

M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 M

В главе 3



Рисунок 1 – Электрофореграмма типовых результатов анализа уровня фрагментирования суммарной ДНК, выделенной из сырого, пастеризованного молока; СЦМ, сыра и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске наборами №1-№5; М – маркер длин («1 kb DNA Ladder»)

продемонстрированы результаты собственных исследований. На первом этапе проведен сравнительный анализ экстракции ДНК из козьего молока и продуктов его переработки с использованием коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот. Результаты аналитического электрофореза зафиксировали наибольшую долю высокомолекулярной ДНК при экстракции нуклеиновых кислот из сырого и сухого козьего молока с помощью наборов №1, №2 и №5 (рисунок 1).

Также наличие высокомолекулярной ДНК было зафиксировано при выделении нуклеиновых кислот из сыра с использованием наборов №1, №3 и №4. Наименьшее количество выделенной ДНК обнаружено при экстракции нуклеиновых кислот из пастеризованного молока и кисломолочного продукта на

йогуртовой закваске наборами №3, №4 и №5. После измерения флуориметрических параметров препаратов нуклеиновых кислот строили графики суммарного выхода экстрагируемой ДНК (рисунок 2). Установлено, что наиболее высокий выход наблюдался при выделении ДНК из сыра. В то же время, самый низкий выход ДНК был получен при экстракции нуклеиновых кислот из кисломолочного продукта на йогуртовой закваске.

Результаты измерения выхода суммарной ДНК показали, что среди всех использованных наборов наибольший средний выход из анализируемых молочных матриц обеспечивали протоколы на основе кремниевых сорбентов (наборы №1 и №3). Следует отметить, что набор №4 демонстрировал самый низкий средний выход ДНК со всеми тремя видами молока. Более того, сравнение значений общего выхода ДНК из сыра показало, что наименее эффективными при работе с данным типом образцов были наборы №2 и №5.



Рисунок 2 – Средний выход ДНК, выделенной из молочных продуктов

В ходе измерений коэффициентов поглощения установлено, что набор №3 показал наилучшие результаты получения высокоочищенных образцов ДНК из анализируемых молочных продуктов. Высокие средние значения коэффициента $A_{260/280}$ при использовании данного протокола были выше эталонного ($\sim 1,8$), что свидетельствует о надлежащем качестве выделенной ДНК с минимальным содержанием белковых загрязнений. В ходе применения других коммерческих наборов были получены препараты ДНК с более низкой степенью чистоты (таблица 2).

Таблица 2 – Определение коэффициентов A260/280, A260/230 проб ДНК

Продукт	Коэффициент	Набор №1	Набор №2	Набор №3	Набор №4	Набор №5
Сырое козье молоко	A260/280	1,65±0,17	1,02±0,07	1,96±0,06	1,40±0,07	1,62±0,25
	A260/230	0,05±0,03	0,60±0,49	0,87±0,56	0,37±0,07	0,50±0,38
Пастеризованное козье молоко	A260/280	1,67±0,12	1,30±0,19	1,83±0,11	1,48±0,12	1,17±0,11
	A260/230	0,03±0,01	0,35±0,14	1,16±0,39	0,39±0,08	0,25±0,06
Сухое козье молоко	A260/280	1,88±0,01	1,34±0,25	1,91±0,05	1,46±0,05	1,75±0,21
	A260/230	0,96±0,37	0,39±0,16	1,76±0,37	0,58±0,25	2,3±3,54
Сыр из козьего молока	A260/280	1,64±0,23	1,16±0,08	1,92±0,16	1,90±0,21	1,18±0,09
	A260/230	0,78±0,48	0,27±0,06	1,73±0,64	1,36±0,33	0,34±0,11
Кисломолочный продукт из козьего молока	A260/280	1,03±0,20	2,02±0,03	1,85±0,11	1,17±0,19	1,03±0,18
	A260/230	0,37±0,29	1,17±0,09	0,49±0,22	0,21±0,05	0,37±0,27

Определение коэффициента A260/230 показало, что протокол №3 также позволяет получать более высокочищенные препараты ДНК с высокой степенью очистки от компонентов, используемых для лизиса образцов. В то же время наборы №2, №4 и №5 демонстрировали более низкие значения коэффициента A260/230 после экстракции ДНК и очистки образцов. Набор №1 показал низкую эффективность очистки выделяемой из молочных матриц ДНК, в особенности при работе с сырым ($A260/230 \sim 0,05 \pm 0,03$) и пастеризованным козьим молоком ($A260/230 \sim 0,03 \pm 0,01$), что может свидетельствовать о наличии в образцах контаминирующих веществ белковой природы.

Кроме того, протокол на основе высаливания демонстрировал самые низкие средние значения показателя A260/230 в случае сухого молока ($\sim 0,39 \pm 0,16$) и сыра ($\sim 0,27 \pm 0,06$). Таким образом, полученные результаты показывают, что метод фенол-хлороформной экстракции (набор №3) обеспечивал наиболее эффективную очистку как от хаотропных солей, так и от веществ органической и белковой природы. Применение критерия Краскелла-Уоллиса показало наличие значимых различий выхода ДНК, коэффициентов A230/260 и A260/280 между пятью методами выделения нуклеиновых кислот при уровне значимости (α), равном 0,05 и степени свободы равной 4.

Анализ результатов ПЦР с праймерами СН-F и СН-R показал, что при использовании в качестве матрицы образцов ДНК из козьего молока и продуктов на его основе, выделенной методом высаливания, в количестве 20% от общего объема реакционной смеси приводит к частичному или полному ингибированию амплификации. В отличие от метода №2, сорбционные методы (№1, №3 и №4) не препятствуют синтезу ампликонов целевой длины. Тем не менее, использование малых объемов вносимой пробы (4% от общего объема реакционной смеси) не оказывает влияния на эффективность синтеза дочерних цепей ДНК, поскольку во всех анализируемых пробах отмечалось накопление амплифицированных фрагментов (рисунок 3).

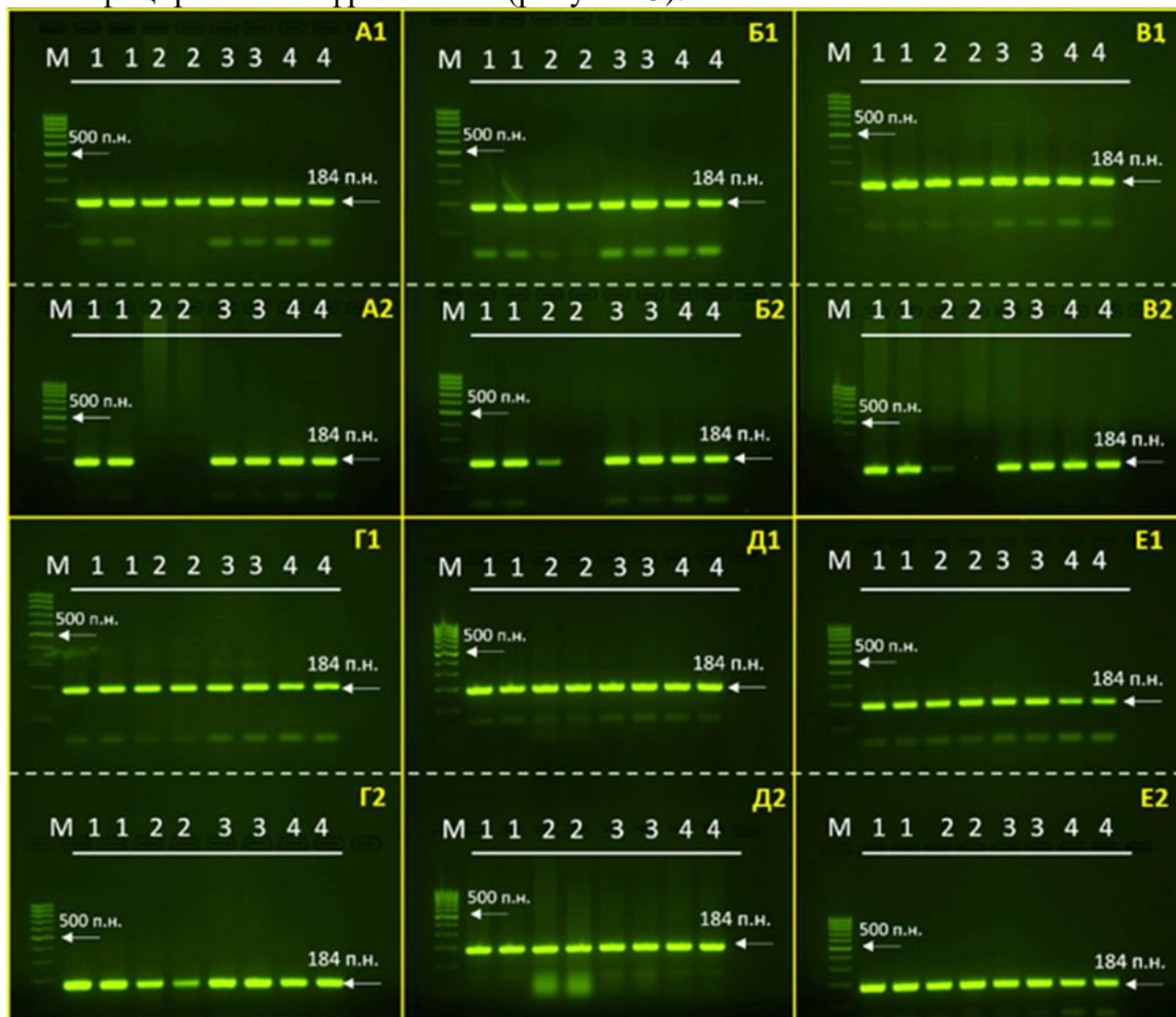


Рисунок 3 – Электрофореграмма типовых результатов ПЦР с праймерами СН-F и СН-R с ДНК, выделенной наборами №1-№4 из козьего сырого (А), пастеризованного (Б), сухого (В), стерилизованного (Г) молока, сыра (Д) и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске (Е) при добавлении 4% объема раствора ДНК (№ «1») и 20% объема (№ «2»);
М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Кроме того, образцы ДНК из козьего молока-сырья и продуктов его переработки, полученные наборами №1-№5 были также проверены методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с олигонуклеотидами D_CH_for, D_CH_rev и D_CH_probe для выявления ампликонов ДНК домашней козы.

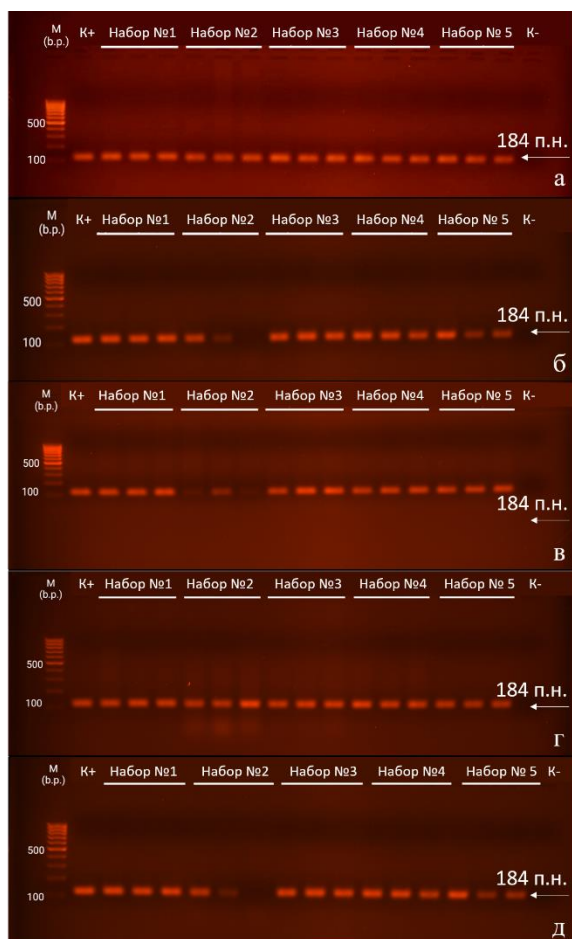


Рисунок 4 – Электрофореграмма типовых результатов ПЦР-РВ с олигонуклеотидами D_CH_for, D_CH_rev и D_CH_probe с ДНК, выделенной наборами №1-№5 из козьего сырого (а), пастеризованного (б), сухого молока (в), сыра (г), кисломолочного продукта на йогуртовой закваске (д); «K+» – геномная ДНК козы; «K-» – отрицательный контроль; М – маркер («100 + DNA Ladder»)

Анализ показал, что все продукты выработаны исключительно из козьего молока, так как во всех пробах наблюдался только ампликон размером 184 п.н., полученный при амплификации ДНК *Capra hircus*. При этом продукт амплификации ДНК *Bos taurus* размером 583 п.н. не был обнаружен в анализируемых образцах. Установлено, что при работе с молочными матрицами сорбционные методы экстракции ДНК обладают рядом преимуществ по сравнению с методом высаливания.

Установлено, что применение набора реагентов №2 также может приводить к снижению эффективности амплификации и появлению ложноотрицательных результатов ПЦР-РВ даже при использовании малых объемов вносимой пробы ДНК (рисунок 4). Кроме того, исследуемые продукты были проверены на наличие коровьей ДНК методом качественной ПЦР с использованием двух пар олигонуклеотидных праймеров, комплиментарных митохондриальным участкам ДНК коровы (BT-F, BT-R) и козы (CH-F, CH-R) (рисунок 5).

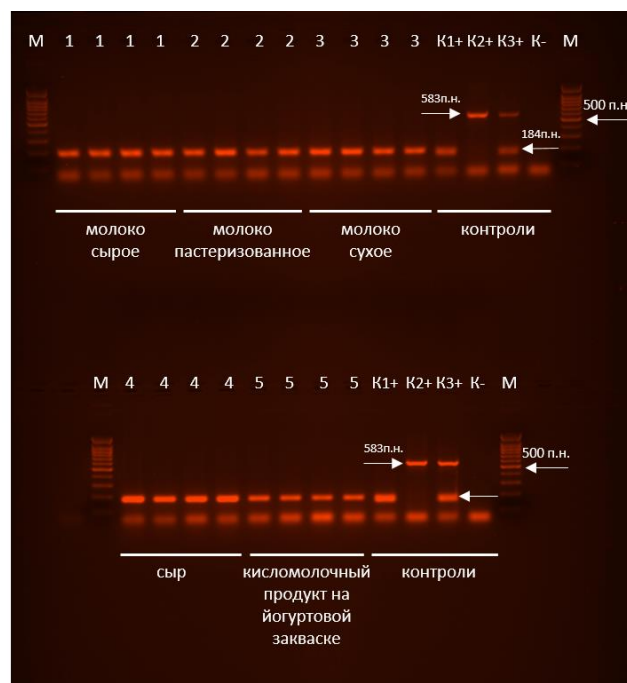
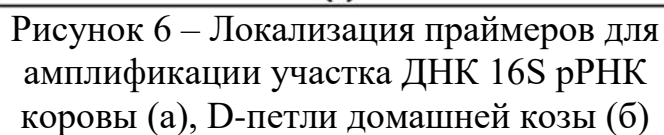


Рисунок 5 – Электрофореграмма типовых результатов ПЦР с праймерами BT-F, BT-R и CH-F, CH-R с ДНК из козьего сырого (1), пастеризованного молока (2), СЦМ (3), сыра (4), кисломолочного продукта на йогуртовой закваске (5); «K1+» – геномная ДНК козы; «K2+» – геномная ДНК коровы; «K3+» – геномная ДНК козы и коровы; «K-» – отрицательный контроль; М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)



Однако при попытке амплификации фрагмента гена 16S рРНК *Bos taurus* на матрице суммарной ДНК, выделенной из стерилизованного молока, амплифицированные продукты не наблюдались, что, вероятно, связано с сильным повреждением молекул ДНК в процессе стерилизации молока, приводящей к образованию фрагментов с длиной, недостаточной для синтеза ампликонов требуемой протяжённости. Тем не менее, амплифицированные фрагменты козьей ДНК были получены и визуально детектированы, что подтверждает возможность выявления продуктов ПЦР меньшей длины. Симплексный ПЦР-анализ с праймерами СН-F и СН-R высокочувствителен в отношении ДНК козы и способен определять наличие козьего молока ($\geq 1\%$) в различных бинарных молочных матрицах, поскольку во всех пробах с козьей ДНК наблюдался ПЦР-продукт размером 184 п.н. (рисунок 7).

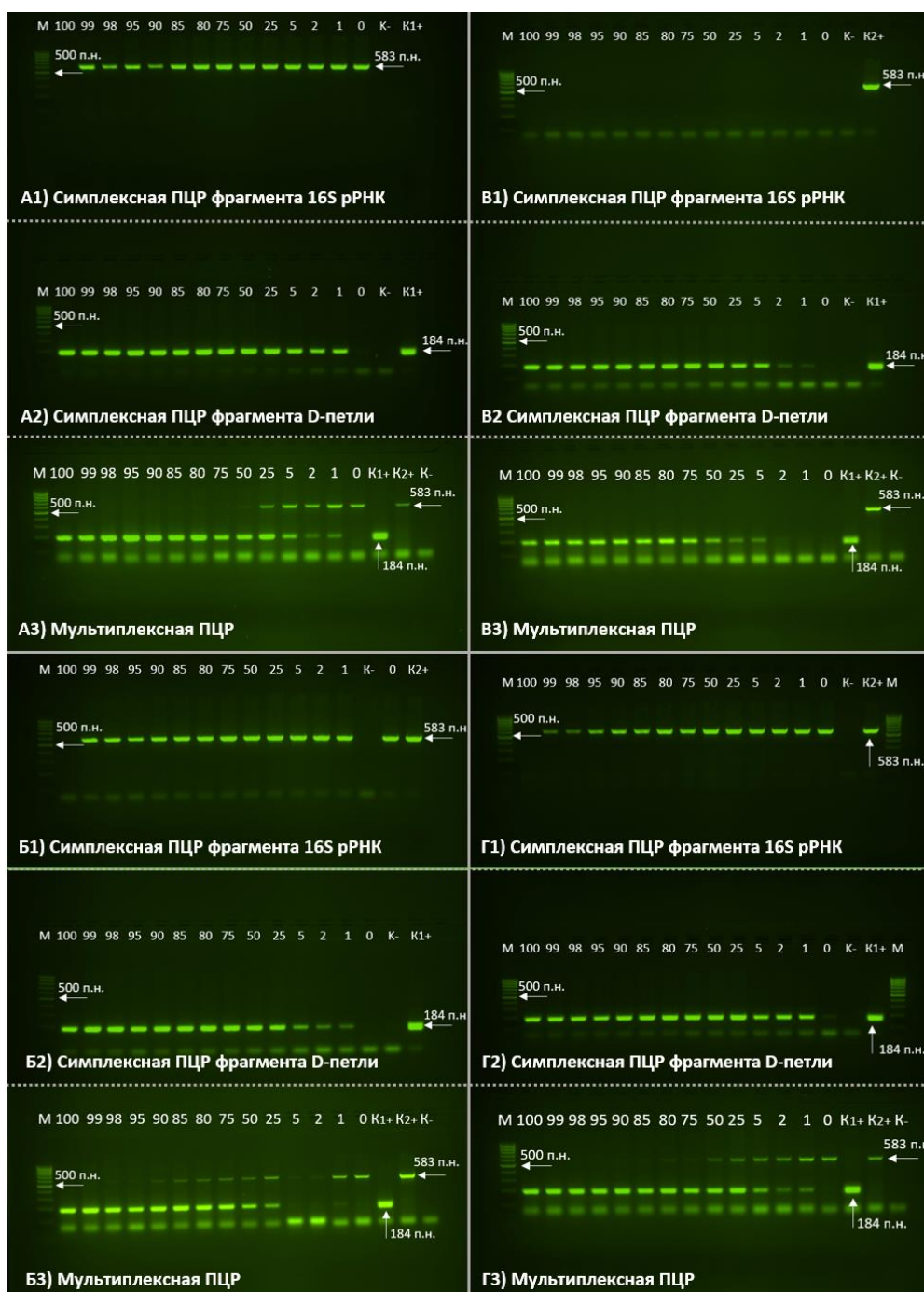


Рисунок 7 – Электрофореграмма типовых результатов симплексной ПЦР фрагментов 16S рРНК коровы (А1, Б1, В1, Г1) и D-петли козы (А2, Б2, В2, Г2) и мультиплексной ПЦР (А3, Б3, В3, Г3); 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из смесей сырого (А), пастеризованного (Б), стерилизованного молока (В) и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске (Г) с соответствующей объемной долей козьего молока; «К-» – (отрицательный контроль); «К1+» – ДНК козы; «К2+» – ДНК коровы; М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

При проведении мультиплексной ПЦР относительный предел чувствительности при амплификации коровьей ДНК составил от 10% до 50%, в зависимости от вида молочной продукции. Ампликоны, полученные с мтДНК козы в ходе мультиплексной ПЦР присутствовали на электрофореграммах всех исследованных бинарных матриц, что указывает на высокую чувствительность дуплексной ПЦР при амплификации козьей ДНК, нижний предел выявления которой составил 5% для стерилизованного молока и 1% – для остальных продуктов.

Стоит отметить, что в отличие от классических качественных методов ПЦР, регистрирующих результаты по конечной точке, ПЦР-РВ не требует электрофоретического разделения ампликонов, что уменьшает риск потенциальной контаминации. Кроме того, детекция флуоресцентного сигнала в режиме реального времени позволяет проводить автоматическую регистрацию результатов амплификации и количественную оценку содержания целевой ДНК в исследуемом образце.

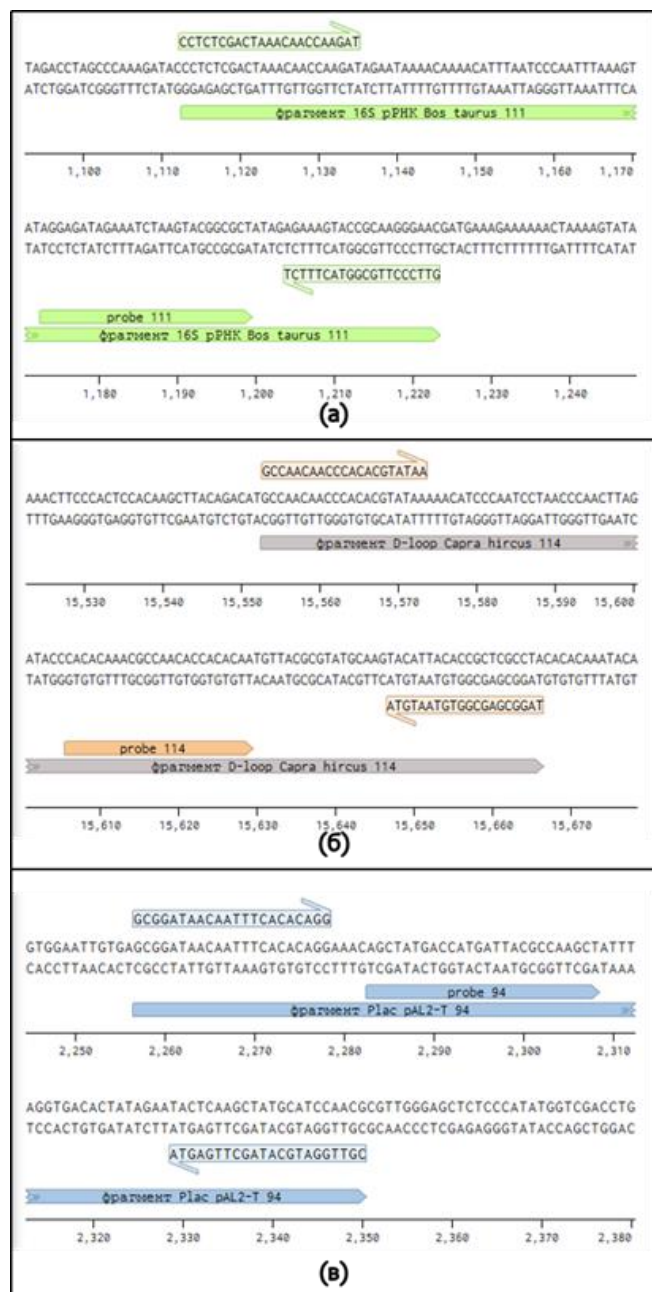


Рисунок 8 – Локализация праймеров и зондов для амплификации участка ДНК 16S рРНК коровы (а), D-петли домашней козы (б) и Plac вектора рAL2-T (в)

Разработка дизайна олигонуклеотидных праймеров, направленных на амплификацию более коротких фрагментов, повышает чувствительность метода ПЦР-РВ. При этом применение технологии TaqMan позволяет одновременно идентифицировать несколько молекулярных мишеней в одной реакционной смеси, включая внутренний положительный контроль (ВКО), что обеспечивает надёжность молекулярно-генетического анализа.

Для проведения параллельной амплификации и детекции сигнала в режиме реального времени были разработаны олигонуклеотидные праймеры и зонды, обеспечивающие амплификацию видоспецифичных фрагментов мтДНК жвачных и ДНК вектора рAL2-T, выбранного в качестве ВКО (рисунок 8). В ходе проведения биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей геномов крупного и мелкого рогатого скота были использованы последовательности 16S рРНК *Bos taurus* и D-петли *Capra hircus* полных референсных митохондриальных геномов, депонированных в публично доступную базу данных GenBank (Национальный центр биотехнологической информации, США) под номерами NC_006853.1 и NC_005044.2 соответственно.

Дизайн олигонуклеотидов осуществлялся с помощью специализированного программного обеспечения Primer3 и Primer-BLAST. Праймеры подбирались с таким расчётом, чтобы амплифицировать фрагменты длиной не более 120-150 п.н. Такая длина продуктов обеспечивает

эффективность ПЦР, близкую к максимальной, и повышает вероятность успешного протекания ПЦР с использованием сильно деградированных матриц. Из полученных 10 пар праймеров и соответствующих им зондов на основе анализа термодинамических параметров и вероятности образования вторичных структур с использованием пакета ПО Vector NTI 11.5 для дальнейшей работы были отобраны праймеры D_CN (прямой и обратный), 16_BT (прямой и обратный) и vko_P (прямой и обратный) для амплификации участков D-петли домашней козы, 16S рРНК домашнего быка и *Plac* вектора рAL2-T соответственно, а также соответствующие им зонды.

Специфичность праймеров *in silico* проверялась с использованием платформы UCSC Genome Browser. Было показано отсутствие амплификации фрагментов ДНК других видов животных, а также неспецифических продуктов реакции при использовании геномов целевых видов. Эффективность ПЦР-РВ определяли с использованием метода последовательных разбавлений образца и разработанных праймеров и зондов. По полученным значениям пороговых циклов (C_t) строили калибровочную прямую в координатах $\log[N]/C_t$, где N – количество суммарной ДНК на реакцию.

Для каждой концентрации ДНК анализировали 8 повторных ПЦР-РВ реакций. В результате было установлено, что амплификация фрагмента 16S рРНК *Bos taurus* при использовании описанного выше набора олигонуклеотидов наблюдалась в динамическом диапазоне от 10 нг до 0,001 нг суммарной ДНК (рисунок 9).

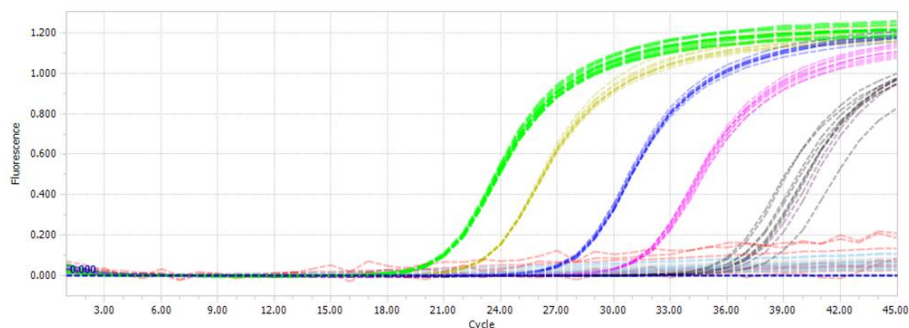


Рисунок 9 – Графики кривых амплификации суммарной ДНК *B. taurus*

В этих пределах сохранялась линейность зависимости величины C_t от $\log[N]$ и было возможно количественное определение содержания молекулы-мишени в исследуемых образцах (рисунок 10).

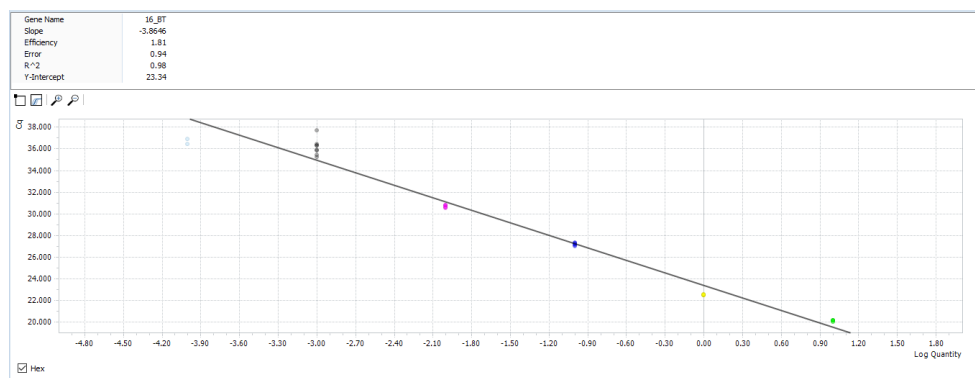


Рисунок 10 – График стандартной кривой при амплификации суммарной ДНК *B. taurus*

Анализ графика зависимости C_t от исходной концентрации матрицы, полученного в ходе амплификации последовательных десятикратных разбавлений образца суммарной ДНК коровы, позволил установить основные характеристики ПЦР-РВ. Эффективность ПЦР-РВ с использованием в качестве мишени суммарной ДНК составила 1,81. Угловой коэффициент прямой был равен -3,8646. Коэффициент корреляции составил 0,98. Аналогичные эксперименты были проведены в отношении набора олигонуклеотидов (D_CH_for + D_CH_rev + D_CH_probe). В результате установлено, что амплификация фрагмента D-петли мтДНК *Capra hircus* наблюдалась в динамическом диапазоне от 10 нг до 0,0001 нг суммарной ДНК (рисунок 11).

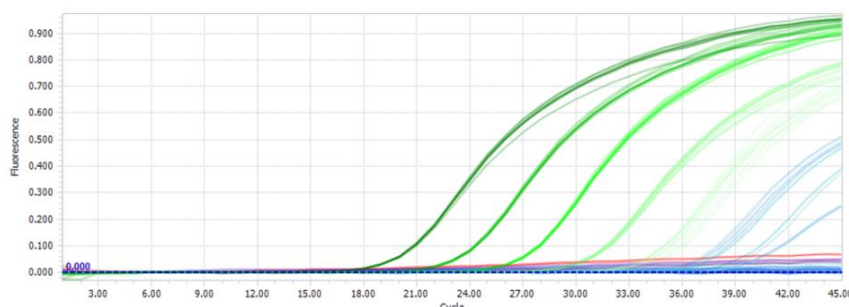


Рисунок 11 – Графики кривых амплификации суммарной ДНК *C. hircus*

В этих пределах сохранялась линейность зависимости величины C_t от $\log[N]$, что делает возможным количественное определение содержания молекулы-мишени в исследуемых образцах (рисунок 12).

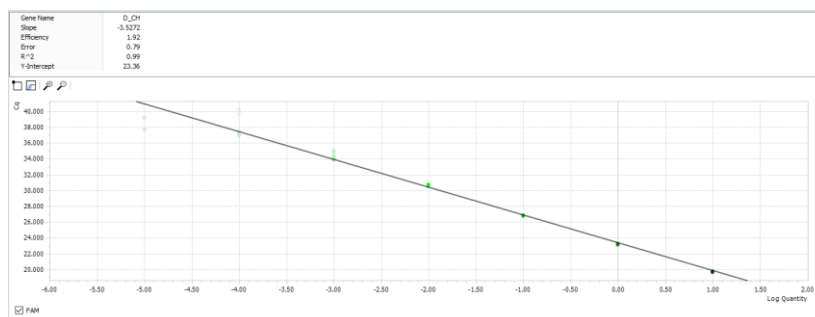


Рисунок 12 – График стандартной кривой при амплификации суммарной ДНК *C. hircus*

Анализ графиков зависимости значений C_t от исходного количества специфических матриц в реакционной смеси, полученных в ходе амплификации последовательных десятикратных разбавлений образца суммарной ДНК козы, позволил установить основные характеристики ПЦР-РВ. Эффективность ПЦР-РВ с использованием в качестве мишени суммарной ДНК козы составила 1,92. Угловой коэффициент прямой был равен -3,5272. Коэффициент корреляции составил 0,99. В результате анализа набора олигонуклеотидов (vko_P_for + vko_P_rev + vko_P_probe) установлено, что амплификация фрагмента *Plac* вектора pAL2-Т при использовании соответствующего набора праймеров и зонда наблюдалась в динамическом диапазоне от 10 нг до 0,000001 нг ДНК (рисунок 13).

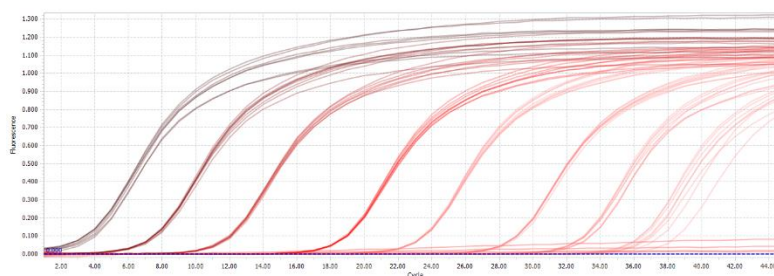


Рисунок 13 – Графики кривых амплификации ДНК вектора pAL2-T

В этих пределах сохранялась линейность зависимости величины C_t от $\log[N]$, что делает возможным количественное определение содержания молекулы-мишени в исследуемых образцах (рисунок 14).

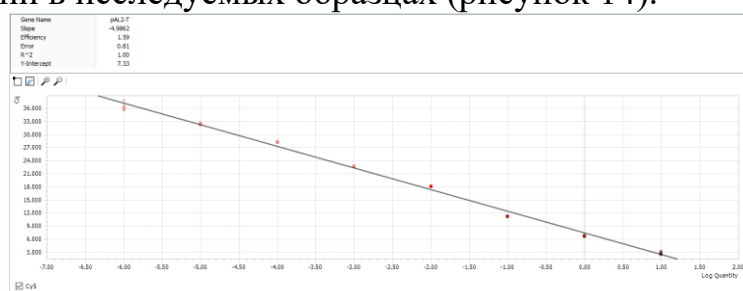


Рисунок 14 – График стандартной кривой при амплификации ДНК вектора pAL2-T

В результате разработан дизайн олигонуклеотидов, обеспечивающих одновременную детекцию флуоресцентных сигналов при амплификации специфических участков ДНК коровы (*Bos taurus*), козы (*Capra hircus*) и ВКО. Созданная панель олигонуклеотидов обеспечивает проведение мультиплексной ПЦР-РВ для диагностики *in vitro*.

Определение ряда ключевых метрологических характеристик метода амплификации мтДНК домашнего быка осуществляли с использованием положений ГОСТ Р 70150-2022 и ГОСТ Р 8.1039-2024. Значение абсолютного предела обнаружения (LODabs) определяли, анализируя не менее 60 повторов ПЦР-РВ для каждой измеряемой концентрации ДНК (таблица 3).

Таблица 3 – Предел обнаружения мтДНК *Bos taurus*

Концентрация коровьей ДНК, нг/реакция	C_t , циклов	SD, циклов
1	22,70	0,11
0,001	35,45	1,07
0,0005	37,10	1,10
0,0001	37,37	0,71
ОКО	-	-

LODabs составляет 0,0005 нг суммарной коровьей ДНК на реакцию, при котором все 60 повторов положительны. Динамический диапазон амплификации фрагмента гена 16S рРНК определяли при серийных разведениях ДНК *Bos taurus* от 10 до 0,000001 нг суммарной ДНК на реакцию (рисунок 15).

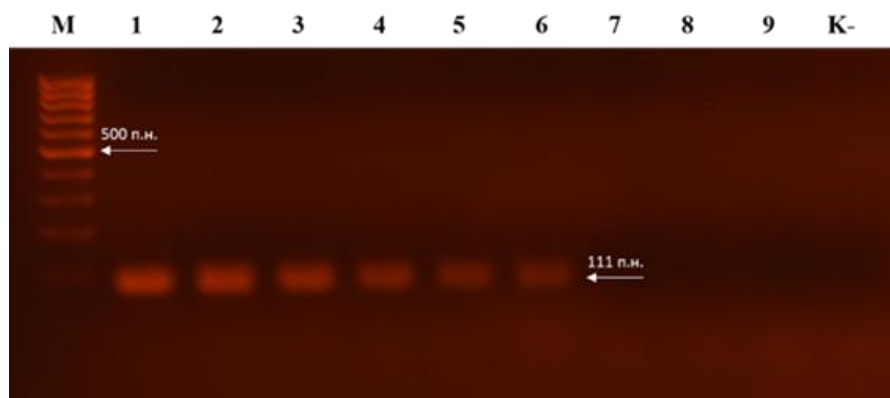


Рисунок 15 – Электрофореграмма типовых результатов определения абсолютного LOD коровьей ДНК (1 – 10 нг ДНК; 2 – 1 нг ДНК; 3 – 0,1 нг ДНК; 4 – 0,01 нг ДНК; 5 – 0,001 нг ДНК; 6 – 0,0005 нг ДНК; 7 – 0,0001 нг ДНК; 8 – 0,00001 нг ДНК; 9 – 0,000001 нг ДНК; «К-» – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК 100+ bp)

Определение значения LODabs козьей ДНК проводили аналогично, путём анализа 60 отдельных реакций ПЦР-РВ для каждой измеряемой концентрации ДНК *C. hircus* (таблица 4).

Таблица 4 – Предел обнаружения мтДНК *Capra hircus*

Концентрация козьей ДНК, нг/реакция	C _t , циклов	SD, циклов
1	23,20	0,07
0,001	34,24	0,47
0,0001	37,89	1,28
0,00001	38,48	1,07
ОКО	-	-

В результате установлено, что LODabs ДНК *C. hircus* составляет 0,00001 нг на реакцию, при котором все 60 повторов реакций положительны. Динамический диапазон амплификации участка D-петли при серийных разведениях ДНК *Capra hircus* определяли в пределах, охватывающих количество ДНК от 10 до 0,000001 нг суммарной ДНК на реакцию (рисунок 16).



Рисунок 16 – Электрофореграмма типовых результатов определения абсолютного LOD козьей ДНК (1 – 10 нг ДНК; 2 – 1 нг ДНК; 3 – 0,1 нг ДНК; 4 – 0,01 нг ДНК; 5 – 0,001 нг ДНК; 6 – 0,0001 нг ДНК; 7 – 0,00001 нг ДНК; 8 – 0,000001 нг ДНК; «К-» – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК 100+ bp)

При определении предела количественного измерения, выраженного в виде детектируемой массовой доли чужеродной ДНК, оценкой результатов 64 отдельных испытаний 3 различных массовых концентраций коровьей ДНК

относительно козьей ДНК установлено, что относительный предел количественного определения (LOQ) составляет не менее 1% в дуплексном режиме (таблица 5).

Таблица 5 – Значения C_t при разных массовых концентрациях суммарной коровьей ДНК в смеси

Массовая концентрация ДНК <i>B. taurus</i> , %	C_t , циклов	SD, циклов
10	25,11	0,34
1	28,71	1,81
0,1	-	-
ПКО-Ch	37,82	1,95
ОКО	-	-

Оценка сходимости результатов мультиплексной ПЦР-РВ коровьей ДНК с применением набора олигонуклеотидов 16_BT+vko_P показала, что коэффициент вариации (CV) между значениями C_t , полученных для каждой точки в 24 повторях, одним оператором, на одном приборе, в один день дважды, не превышал 3% (таблица 6).

Таблица 6 – Оценка сходимости результатов амплификации ДНК домашнего быка

Концентрация ДНК, нг/мкл	C_t , среднее	C_t , среднеквадратическое отклонение	CV, %
3	23,00	0,14	0,60
1	25,01	0,08	0,34
0,1	28,22	0,12	0,43
0,01	31,77	0,29	0,91
0,001	36,17	1,08	3,00

Определение воспроизводимости значений C_t при амплификации фрагментов ДНК домашнего быка и ВКО методом мультиплексной ПЦР-РВ показало, что CV между значениями C_t , полученных для каждой точки в 16 повторях, составлял от 3,4% до 5,5% (таблица 7).

Таблица 7 – Оценка воспроизводимости результатов амплификации ДНК

Концентрация ДНК, нг/мкл	C_t , среднее	C_t , среднеквадратическое отклонение	CV, %
3	21,67	1,19	5,50
1	23,76	1,22	5,15
0,1	27,02	1,30	4,8
0,01	30,88	1,05	3,4
0,001	37,34	1,97	5,29

Для оценки стабильности набора реагентов для одновременной амплификации ДНК *Bos taurus* и ВКО были проведены многократные циклы замораживания-оттаивания. CV между значениями C_t для каждой точки находился в диапазоне от 0,71% до 2,99%. Следовательно, разработанный набор реагентов с использованием зондов технологии TaqMan стабилен при хранении и устойчив к повторным размораживаниям, поскольку значение CV не превышает 10% (таблица 8).

Таблица 8 – Оценка стабильности набора реагентов для амплификации ДНК

Количество ДНК на реакцию, нг	1 цикл		5 циклов		10 циклов		CV ₁₋₁₀ , %
	C _t , среднее±СКО	CV, %	C _t , среднее±СКО	CV, %	C _t , среднее±СКО	CV, %	
3	22,91±0,14	0,63	23,19±0,03	0,15	23,17±0,16	0,69	0,86
1	24,62±0,09	0,39	24,79±0,02	0,09	24,84±0,17	0,7	0,71
0,1	27,63±0,21	0,76	27,97±0,09	0,33	28,12±0,12	0,42	1,09
0,01	30,7±0,39	1,26	31,21±0,31	1,01	31,47±0,23	0,72	1,6
0,001	35,7±1,33	3,72	34,85±0,55	1,58	35,58±0,73	2,06	2,99

В результате проведённых исследований предлагается следующий вариант комплектации набора реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа (таблица 9).

Таблица 9 – Комплектация набора реагентов

Набор	Состав набора реагентов
«ПЦР-смесь-1»	Концентрированный буфер для ПЦР, содержащий 15 ммоль MgCl ₂ , по 0,75 ммоль/мкл каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, ДНК-полимеразу Taq в количестве 5 ед./мкл (коэффициент разбавления 5), 0,0001 нг/мкл ДНК вектора pAL2-T (ВКО)
«ПЦР-смесь-2»	Водный раствор специфических праймеров и зондов
«ПКО С1»	Водный раствор, содержащий 10 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С2»	Водный раствор, содержащий 1 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С3»	Водный раствор, содержащий 0,1 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С4»	Водный раствор, содержащий 0,01 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С5»	Водный раствор, содержащий 0,001 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ОКО»	Деионизованная вода

В ходе экспериментальных исследований разработан стандарт организации (СТО) 00419785-083-2025, позволяющий проводить количественное определение ДНК *Bos taurus* в исследуемых образцах методом мультиплексной ПЦР-РВ. Результаты исследования 31 образца фермерских и промышленных продуктов на основе козьего молока показали, что 40% образцов содержали незадекларированное количество ДНК *Bos taurus*.

Оценка текущих затрат при разработке метода показала, что себестоимость анализа одного образца составила 255 руб., временные затраты на анализ 42 образцов в двух технических повторностях составили 20,25 часов при трудозатратах в 6779 руб. Сравнительный анализ с методом хроматографии выявил, что молекулярно-генетический метод обеспечивает снижение расчетных трудозатрат на 16898 руб. при исследовании аналогичного количества образцов (n = 42) в двух технических повторностях, что свидетельствует о его существенной экономической эффективности. Полученные результаты обосновывают внедрение разработанного метода для диагностики *in vitro* при идентификации видового состава молока и продуктов на их основе.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Проведен структурированный обзор научной литературы, освещающей вопросы идентификации и выявления фальсификации козьего молока-сырья и продуктов на его основе, с помощью молекулярно-генетических методов с целью обеспечения подлинности и безопасности молочной продукции. Установлено, что в настоящее время отсутствуют отечественные наборы реагентов для количественного определения содержания ДНК *Bos taurus* в молоке и прошедших технологическую обработку молочных продуктах.

2. Проведен сравнительный анализ эффективности пяти коммерческих наборов для экстракции нуклеиновых кислот «ДНК-сорб-С-М» (набор №1), «ДНК-Экстран-2» (набор №2), «Сорб-ГМО-Б» (набор №3), «ГМО-МагноСорб» (набор №4) и «К-Сорб» (набор №5). Комплект реагентов «Сорб-ГМО-Б» обеспечивает получение препаратов ДНК с высокой степенью очистки от хаотропных солей и белковых компонентов матрицы, а также максимальный выход суммарной ДНК из образцов козьего молока и продуктов на его основе.

3. Проведен биоинформатический анализ последовательностей ДНК для выявления чужеродных геномов в продуктах переработки козьего молока. Разработана панель олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных зондов для амплификации видоспецифических участков митохондриальной ДНК домашнего скота (*Bos taurus* и *Capra hircus*) и вектора pAL2-T. Установлено, что предел количественного определения коровьей ДНК составляет 0,001 нг суммарной ДНК на реакцию.

4. Разработан молекулярно-генетический метод детекции коровьей ДНК и произведена оценка его ключевых метрологических характеристик. Сходимость результатов составляет от 0,34% до 3,00% в зависимости от количества мишени; воспроизводимость результатов составляет от 3,4% до 5,5%. Установлено, что набор реагентов для проведения ПЦР-РВ стабилен при хранении и устойчив к повторным размораживаниям, поскольку значение коэффициента вариации пороговых циклов не превышает 10%.

5. Разработана методика количественного определения ДНК домашнего быка методом ПЦР-РВ. Разработан и утвержден СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

6. Выполнено молекулярно-генетическое тестирование образцов молока и молочных продуктов из козьего молока. Анализ 31 образца фермерских и промышленных продуктов из козьего молока показало незадекларированное присутствие коровьей ДНК в 40% исследованных продуктов.

Список опубликованных трудов

Публикации в научных журналах и изданиях, рецензируемых ВАК

1. Хан, А. В. Проблема фальсификации молочных продуктов: анализ состояния и пути решения / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Молочная промышленность. – 2023. – № 5. – С. 54-56. – DOI 10.21603/1019-8946-2023-5-6
2. Хан, А. В. Молекулярные методы аутентификации молочного сырья в сыре: обзор / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Сыроделие и маслоделие. – 2024. – № 2. – С. 40-47. – DOI 10.21603/2073-4018-2024-2-6
3. Хан, А. В. Молекулярно-генетические методы оценки качества и безопасности молока и молочных продуктов: обзор / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2024. – № 8. – С. 123-127. – DOI 10.52653/PPI.2024.8.8.024
4. Хан, А. В. Сравнительный анализ видоспецифичных молекулярных маркеров принадлежности молока / А. В. Хан, Д. Д. Коваль, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2024. – № 10. – С. 31-35. – DOI 10.52653/PPI.2024.10.10.005
5. Хан, А. В. Поиск оптимальных методов выделения ДНК из козьего молока и продуктов его переработки / А. В. Хан, Д. Д. Коваль, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Молочная промышленность. – 2024. – № 5. – С. 42-47. – DOI 10.21603/1019-8946-2024-5-8
6. Хан, А. В. Разработка тест-системы на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени для идентификации продуктов из козьего молока / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, Д. Д. Коваль, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2025. – № 2. – С. 11-15. – DOI 10.52653/PPI.2025.2.2.002

Публикации в Трудях НИИ, материалах конференций и специализированных журналах

7. Хан, А. В. Генетические методы для видовой аутентификации сыра / А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Производство сыра, масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения: Сборник материалов международной научно-практической конференции, Углич, 20–22 июня 2023 года. – Углич: ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 2023. – С. 82-84.
8. Хан, А. В. Проблемы безопасности и фальсификации молочных продуктов / А. В. Хан // Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 18 мая 2023 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2023. – С. 207-208.
9. Хан, А. В. К вопросу выявления потенциальной фальсификации козьего молока молекулярно-генетическими методами / А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Актуальная биотехнология. – 2023. – № 2. – С. 32

10. **Хан, А. В.** Методы идентификации молочных продуктов для борьбы с фальсификацией / А. В. Хан // Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова, Санкт-Петербург, 25–26 мая 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – С. 273-274.
11. **Хан, А. В.** Аутентификация йогурта из молока коров и коз / А. В. Хан, О. Ю. Фоменко, Е. Г. Лазарева // XXIII Международная конференция по науке и технологиям Россия- Корея-СНГ: Труды конференции, Москва, 24–26 августа 2023 года. – Новосибирск: Новосибирский государственный технический университет, 2023. – С. 53-57.
12. **Хан А. В.** Проблемы идентификации сухого козьего молока / А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Сборник материалов Поландовских чтений VI международной научно-практической молодежной конференции «Пищевые технологии будущего» (5 июня 2024 г.) /ФГАНУ НИИХП, отв. ред. д.т.н. Мартиросян ВВ-М.: ООО «Белый Ветер». – 2024. – С. 281-284.
13. **Хан, А. В.** Сравнительный анализ симплексной и дуплексной ПЦР для выявления фальсификации козьего молока и продуктов его термической обработки / А. В. Хан, Д. Д. Коваль, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Пищевая метаинженерия. – 2024; – Т. 2, № 3. – С. 12-24. – DOI: 10.37442/fme.2024.3.63
14. **Хан, А. В.** К вопросу применения ПЦР для видовой идентификации молочной продукции / А. В. Хан, Д. Д. Коваль // Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. – 2024. – № 1. – С. 277-282.
15. **Хан, А. В.** К вопросу применения мультиплексной прямой ПЦР для оценки подлинности козьего молока / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Научное обеспечение технологического развития и повышения конкурентоспособности в пищевой и перерабатывающей промышленности: Сборник материалов 4-й Международной научно-практической конференции, Краснодар, 26–27 ноября 2024 года. – Краснодар: Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова, 2024. – С. 160-163.

Список сокращений и условных обозначений

мтДНК – митохондриальная ДНК

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

СКО – среднеквадратическое отклонение

LOD – предел обнаружения

LOQ – предел количественного определения

St – пороговый цикл

CV – коэффициент вариации