

**Yelubaeva M.Ye., Serikbaeva A.D., Suleymenova Zh.M., Abduldayeva Z.Zh.**

PRODUCTION OF FERMENTED MILK PRODUCTS FROM CAMEL MILK ON THE  
EQUIPMENT FOR MILK PROCESSING OF EDIBON COMPANY (SPAIN)

**Annotation**

The article presents data on the study of physico-chemical and microbiological indicators of milk, as well as the production of fermented milk products from camel milk such as yoghurt, shubat, cream, soft spread cheese and homemade cheese in the laboratory of "Technology of Food products" in Innovative Research and Education Center from camel milk of the peasant farm "Daulet-Beket".

**Key words:** camel milk, milk acidity, yoghurt, shubat, soft cheese, cream cheese from camel milk.

УДК 636.2:579.835.12

**Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н., Сайдұлдин Е.Т., Абеуов Х.Б.**

*Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы*

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

**Аннотация**

В результате сравнительного анализа различных методов выделения ДНК из биоматериалов для диагностики кампилобактериоза установлено, что при исследовании проб препуциальной слизи быков-производителей методом фенол-хлороформной экстракции с использованием набора Purelink® Genomic DNA Mini Kit с модификацией получена высокая концентрация ДНК.

**Ключевые слова:** диагностика, кампилобактериоз крупного рогатого скота, ДНК, оценка качества, спектрофотометрический метод, аналитическая характеристика.

**Введение**

Кампилобактериоз – инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая патогенными микроорганизмами рода *Campylobacter*, характеризующаяся различной степенью тяжести и полиморфностью проявлений.

При выполнении мероприятий, связанных с профилактикой и ликвидацией кампилобактериоза, большое внимание уделяется диагностике. В диагностике кампилобактериоза бактериологический метод является основным. Согласно руководству Международного Бюро (МЭБ), идентификация самого возбудителя является основным предписывающим тестом [1, 2, 3].

За период последнего десятилетия в ветеринарной практике для диагностики инфекционных заболеваний активно используется полимеразно-цепная реакция (ПЦР) и современная модификация ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Выделение ДНК из исследуемых биологических объектов является первым и наиболее важной стадией проведения ПЦР диагностики инфекционных заболеваний. На рынке в настоящее время представлено множество вариантов наборов выделения нуклеиновых кислот и с различным уровнем автоматизации процесса. Производители используют различные методики, основная суть которых заключается в сорбции

нуклеиновых кислот на носителе или в фазе жидкости с последующим удалением или нейтрализацией посторонних примесей ингибирующих ПЦР.

Все современные методы очистки нуклеиновых кислот по основным физическим и биохимическим признакам можно разделить на две группы: методы поэтапного удаления примесей из водных растворов – жидкофазные и методы, основанные на сорбции нуклеиновых кислот на твердой фазе – твердофазные [4, 5, 6, 7].

Целью исследований являлось выделение ДНК из биоматериалов различными методами.

#### **Материалы и методы исследований**

Исследования с целью диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота и выделение культур возбудителя этого заболевания проводили в лаборатории Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета.

В хозяйствах Алматинской области с диагностической целью для выделения геномной ДНК из исследуемого материала, для ПЦР анализа каждый образец влажной слизи брали от коров отдельным набором инструментов в 1,5 мл пробирки эппендорф и также отдельно в 1,5 мл пробирки эппендорф для микробиологических исследований, от быков-производителей были взяты пробы препуциальной слизи.

Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции (ФХЭ), основанный на использовании органических соединений, в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,5 мл лизирующего раствора, вносили 10–50 мкл пробы. Добавляли 15 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,3 мг/мл) и перемешивали. Затем проводили инкубирование при температуре 56 °С не менее 1 ч. После очистки раствора ДНК от белковых примесей в пробирку с продуктами лизиса добавляли равный объем смеси фенол–хлороформ–изоамиловый спирт (25:24:1). Закрывали пробирку крышкой и тщательно перемешивали, затем проводили центрифугирование в течение 3–5 мин при 10000–15000 об/мин до разделения двух фаз.

Переносили водную фазу (верхнюю) в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, стараясь не захватить нижнюю фазу. Процедуру очистки раствора ДНК повторили несколько раз, после которой в пробирку, содержащую водную фазу, добавляли равный объем водонасыщенного *n*-бутанола. Перемешав и процентрифугировав, переносили водную фазу (нижнюю) в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, в которую добавляли равный объем водонасыщенного диэтилового эфира. Вновь проводили центрифугирование и осторожно удаляли верхнюю фазу, содержащую диэтиловый эфир. Для удаления следов эфира водную фазу в течение 5 мин инкубировали при температуре 70°С. К раствору ДНК добавляли 5М раствор NaCl и 96% этанола, тщательно перемешивав, оставили при температуре -20°С на ночь. После центрифугирования, при 10000–15000 об/мин, удалили супернатант и к осадку добавили 1 мл 80% этанола, снова центрифугировали в том же режиме и удалили супернатант. Осадок растворили в 50 мкл ТЕ-буфера. Выделенную ДНК поместили в морозильник при температуре - 20 °С.

Выделение ДНК из культур *Campylobacter* осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции с модификацией, набором «Cell and Tissue DNA Kit» с помощью автоматической станции выделения НК KingFisher, набором Purelink® Genomic DNA Mini Kit с модификацией, изменением температурного режима. Подготовили растворы для фенол-хлороформного метода. 10% SDS – 200 мгр SDS растворили в 2 мл деионизированной воды, 0,1М Трис – 1 мл 1М Триса разводили 9 мл деионизированной воды, фенол-хлороформный р-р – в 3 мл хлороформа добавили 3 мл фенола.

Фенол-хлороформный метод выделения ДНК с модификацией. Суточную культуру кампилобактерий вносили в 1,5 мл пробирки Eppendorf и центрифугировали 5 мин при 8000 об/мин. Над осадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 500 мкл ТЕ буфера и перемешали на вортексе, добавляли 50 мкл лизоцима. Перемешав в руках не сильно, т.к. фермент разрушается при сильном встряхивании поместили в термостат для инкубирования. Затем добавляли 50 мкл 10% SDS, смешивали, раствор становится прозрачным и вязким. Затем в пробирки добавляли 650 мкл раствора фенол-хлороформа, интенсивно перемешивали, центрифугировали при 12 тыс. об/мин 5 мин. После центрифугирования происходит четкое разделение на 3 фазы, из верхней фазы брали 400 мкл и переносили в новую пробирку, добавляли 10 мкл 0,1М NaCl и 400 мкл изопропилового спирта. После центрифугирования при 10 тыс. об/мин - 1 мин, удаляли над осадочную жидкость. ДНК оседает на дне пробирки, к которой вносили 400 мкл 70% этилового спирта, растворяли в 50 мкл ТЕ буфера.

Оценку качества выделенной ДНК проводили путем количественного определения её концентрации спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000. Метод основан на существовании у ДНК максимума поглощения при длине волны 260 нм. Это означает, что в растворах нуклеиновых кислот максимальная фотометрическая абсорбция наблюдается при 260 нм и прямо коррелирует с концентрацией ДНК.

Анализ качества выделенной ДНК также проводили методом разделения фрагментов ДНК в агарозном геле от 0,8-1,5%, в зависимости от длины анализируемого фрагмента, в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия, который использовали для визуализации ДНК при горизонтальном электрофорезе.

#### **Результаты исследований и обсуждение результатов**

В рамках проведенных исследований, при сравнительной оценке способов выделения ДНК (таблица 1), наибольшей эффективностью в отношении грамтрицательных культур обладает метод ФХЭ. Тем не менее, при выделении ДНК из грамтрицательных культур наибольший выход ДНК был достигнут при использовании фенол-хлороформного метода выделения ДНК с модификацией.

Таблица 1 – Результаты количественной оценки ДНК

Наименование образцов	Концентрация нг/мкл	Абсорбция 260 нм	Абсорбция 280 нм	Соотношение 260/280 нм
ФХЭ грамтрицательная 1	390,35	7,945	3,743	2,05
ФХЭ грамтрицательная 2	146,10	3,062	1,338	2,07
ФХЭ грамтрицательная 3	138,10	2,162	1,210	1,91
ФХЭ грамтрицательная 4	69,15	2,672	1,342	2,31
ФХЭ грамтрицательная 5	88,10	1,162	0,210	2,22
ФХЭ модифицированная 1	338,10	5,472	2,242	2,39
ФХЭ модифицированная 2	147,05	2,954	2,352	2,19
ФХЭ модифицированная 3	189,85	3,797	0,373	1,02
ФХЭ модифицированная 4	44,93	1,899	0,398	2,26
ФХЭ модифицированная 5	99,05	2,707	1,207	2,02

Несмотря на то, что метод ФХЭ даёт хороший результат, он мало пригоден для использования в лабораторной диагностике, из-за трудоёмкости метода, а также из-за токсичности используемых реагентов. Эффективность выделения ДНК с использованием набора «Cell and Tissue DNA Kit» оказалась наименьшей, что возможно связано с необходимостью подбора времени инкубации образцов с лизоцимом и потерями при многократном переносе жидких фаз в новые пробирки.

Высокую концентрацию ДНК из проб препуциальной слизи быков-производителей выделяли при использовании набора Purelink® Genomic DNA Mini Kit с модификацией.

Таким образом, эффективность выделения ДНК с модификацией выше по сравнению с наборами в среднем на 25%. Важно подчеркнуть высокое качество образцов ДНК выделенных с использованием трех методов, о чём свидетельствует значение соотношения адсорбции 260/280.

Для оценки результатов спектрофотометрического метода использовали электрофоретический анализ ДНК (рисунок 1).

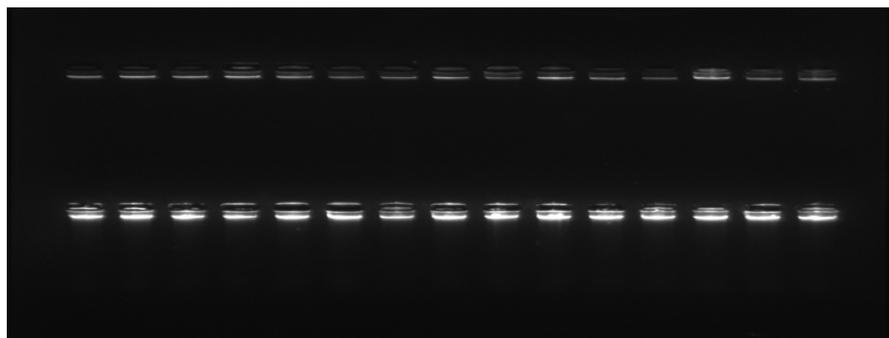


Рисунок 1. Электрофореграмма ДНК кампилобактерий.

#### **Выводы**

Таким образом, в результате исследований был выбран модифицированный метод выделения ДНК из клинического материала, обладающий аналитическими характеристиками.

#### **Литература**

1. Сайт международного эпизоотического бюро [http:// www.oie.int](http://www.oie.int);
2. Casademont I., Bizet C., Chevrier D. & Guesdon J.L. 2000. Rapid detection of *Campylobacter fetus* by polymerase chain reaction combined with non-radioactive hybridization using an oligonucleotide covalently bound to microwells. *Mol. Cell. Probes* 14:233240;
3. Ansari-Lari, M; Hosseinzadeh, S; Shekarforoush, S.S; Abdollahi, M. and Berizi, E. (2011). Prevalence and risk factors associated with *Campylobacter* infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran. *Int. J. Food Microbiol.*, 144: 475-479;
4. Hosseinzadeh, S; Kafi, M. and Pour-Teimouri, M. (2013). Detection of *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* in smegma samples collected from dairy cattle in Fars, Iran, using PCR. *Vet. Res. F.*, In Press;
5. Platts-Mills, J.A. and Kosek, M. (2014) Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 27(5): 444-450;
6. Wei, B., Cha, S.Y., Yoon, R.H., Kang, M., Roh, J.H., Seo, H.S., Lee, J.A. and Jang, H.K. (2016) Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken and duck meat in South Korea. *Food Control*, 62: 63-68;
7. Murray, C.J., Vos, T., Lozano, R., et al. (2012) Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380: 2197-2223.

**Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н., Сайдулдин Е.Т., Абеуов Х.Б.**

КАМПИЛОБАКТЕРИОЗДЫ БАЛАУ ҮШІН БИОМАТЕРИАЛДАРДАН ДНҚ БӨЛІП АЛУ

#### **Аңдатпа**

Кампилобактериозды балау үшін биоматериалдардын ДНҚ бөліп алудың әр түрлі әдістерін салыстырмалы талдаудың нәтижесінде түрлендірілген Purelink® Genomic DNA Mini Kit жиынтығын қолдану арқылы фенол-хлороформ экстракциялау әдісімен өндіруші бұқалардың күпек шырышын тексергенде жоғары концентрациялы ДНҚ алынды.

**Кілт сөздер:** балау, мүйізді ірі қараның кампилобактериозы, ДНҚ, сапасын бағалау, спектрофотометриялық әдіс, талдамалық сипаттама.

**Zhanserkenova O.O., Kasymbekova Sh.N., Sayduldin E.T., Abeouov Kh.B.**

#### **SOLATION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID FROM BIOMATERIALS FOR THE DIAGNOSIS OF CAMPILOBACTERIOSIS**

#### **Annotation**

As a result of a comparative analysis of different methods of DNA isolation from biomaterials for the diagnosis of campylobacteriosis, it has been established that a high concentration of deoxyribonucleic acid has been obtained with the modification of the Purelink® Genomic DNA Mini Kit with modification by examining samples of pre-mucus bulls from the bulls by phenol-chloroform extraction.

**Key words:** diagnostics, campylobacteriosis of cattle, deoxyribonucleic acid, quality assessment, spectrophotometric method, analytical characteristic.

**УДК 63.5995**

**Жапабаева Г., Кожаметов М.К., Муратбекова К.М.**

*Казахский национальный аграрный университет*

#### **ОСОБЕННОСТИ ФАЛЬСИФИКАЦИИ РЫБНЫХ КОНСЕРВОВ**

#### **Аннотация**

В данной статье рассмотрены различные способы фальсификации, последствия от нее, а также изучен рынок рыбных консервов в Казахстане. Кроме того, раскрыты сущность вопроса связанного с фальсификацией рыбных консервов и то, как именно можно сократить количество фальсифицированной продукции на предприятиях Казахстана.

**Ключевые слова:** морепродукты, фальсификация, квалиметрическая, соленая, вяленая, сушеная, ассортимент.

#### **Введение**

Рыба и морепродукты – один из наиболее ценных и питательных продуктов, составляющих значимую часть рациона населения в различных странах мира. Согласно официальным данным Комитета по статистике РК, потребление рыбы и морепродуктов среднестатистическим жителем страны составляет 11 кг/год.

Актуальность выбранной темы заключается в том, в настоящее время проблемы фальсификации стоят очень остро. Это связано с большим количеством фальсифицированной продукции на нашем рынке.