

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-3-324-334>



Поступила 13.01.2025

Поступила после рецензирования 25.07.2025

Принята в печать 29.07.2025

© Фомина Т. А., Хвостов Д. В., Минаев М. Ю., Утьянов Д. А., 2025

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОСПЕЦИФИЧНОЙ ДНК САЙРЫ (*COLOLABIS SAIRA*) И ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ САРДИНЫ, ИВАСИ (*SARDINOPS MELANOSTICTUS*)

Фомина Т. А.^{1,2}, Хвостов Д. В.^{1*}, Минаев М. Ю.¹, Утьянов Д. А.¹

¹Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Россия, Москва

²Национальный центр безопасности рыбной и сельскохозяйственной продукции, Россия, Москва

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

видовой состав,
идентификация
рыб, ДНК, *Cololabis*
saira, *Sardinops*
melanostictus, ПЦР

В статье представлены разработка и апробация метода мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для видовой идентификации консервированной продукции из сайры (*Cololabis saira*) и дальневосточной сардины (иваси) (*Sardinops melanostictus*). Методика основана на использовании системы олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» и направлена на решение проблемы фальсификации рыбной продукции, которая широко распространена на российском рынке. Для оценки специфичности метода была использована контрольная панель из 90 видов рыб, а также 195 образцов пищевой рыбной продукции. Метод продемонстрировал высокую чувствительность, позволяя выявлять ДНК целевых видов при содержании до 0,01 % в образце. Специфичность праймеров подтверждена отсутствием амплификации ДНК неродственных видов. Проведенные эксперименты показали, что заявленные виды рыбы корректно идентифицируются в 100 % случаев, а ложноотрицательные результаты отсутствуют. Результаты исследования пищевой продукции продемонстрировали несоответствия в 34 % образцов консервов из сайры, из которых 21 % заменены сардиной, а 6 % — тихоокеанской сельдью. Разработанная методика снижает затраты на анализ за счет отсутствия зависимости от импортных реагентов и может быть внедрена в лабораториях, работающих с ГМО и видовой идентификацией. Выводы подтверждают эффективность предложенного подхода для контроля качества и предотвращения фальсификации рыбной продукции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FGUS-2025-0009 ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН.

Received 13.01.2025

Accepted in revised 25.07.2025

Accepted for publication 29.07.2025

© Fomina T. A., Khvostov D. V., Minaev M. Yu., Utyanov D. A., 2025

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR FOR SPECIES-SPECIFIC DNA DETERMINATION OF SAURY (*COLOLABIS SAIRA*) AND FAR EASTERN SARDINE, IVASI (*SARDINOPS MELANOSTICTUS*)

Tatyana A. Fomina^{1,2}, Daniil V. Khvostov^{1*}, Mihail Yu. Minaev^{1*}, Dmitry A. Utyanov¹

¹V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

²Nation Center for Fish and Agricultural Product Safety, Moscow, Russia

KEY WORDS:
species composition,
fish identification,
DNA, *Cololabis*
saira, *Sardinops*
melanostictus, PCR

ABSTRACT

The paper presents the development and validation of a multiplex real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) method for species identification of canned products from saury (*Cololabis saira*) and Far Eastern sardine (Ivasi) (*Sardinops melanostictus*). The method is based on the use of the oligonucleotide system «Saury-Ivasi-VKO» and is aimed at solving the problem of adulteration of fish products, which is widespread in the Russian market. To assess the specificity of the method, a control panel of 90 fish species and 195 food fish samples were used. The method demonstrated high sensitivity, allowing detection of DNA of target species at up to 0.01 % in the sample. The specificity of primers was confirmed by the absence of DNA amplification of unrelated species. The conducted experiments showed that the declared fish species were correctly identified in 100 % of cases, and there were no false negative results. The results of food product testing revealed nonconformities in 34 % of canned saury samples, of which 21 % were replaced by sardine and 6 % by Pacific herring. The developed methodology reduces the cost of analysis due to the lack of dependence on imported reagents and can be implemented in laboratories working with GMOs and species identification. The conclusions confirm the effectiveness of the proposed approach for quality control and prevention of adulteration of fish products.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FGUS-2025-0009 of the state assignment of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS.

1. Введение

Рыбная промышленность играет ключевую роль в обеспечении продовольственной безопасности и удовлетворении потребительского спроса на высокобелковые продукты. На российском потребительском рынке традиционно представлено большое разнообразие консервированной продукции из сайры (*Cololabis saira*) и дальневосточной сардины (иваси) (*Sardinops melanostictus*).

Тихоокеанская сайра (*Cololabis saira*) является одним из ключевых пелагических видов, имеющих высокую коммерческую значимость

для рыболовной промышленности Японии, Тайваня, Российской Федерации и Южной Кореи. Она широко распространена в северной части Тихого океана, обитает в субтропических и субарктических водах. Данный вид характеризуется сравнительно коротким жизненным циклом, продолжительность которого составляет около двух лет. Размножение данного вида носит пролонгированный характер: период нереста каждой особи может быть длительным, а общий сезон размножения охватывает осенне-зимний период, иногда продлеваясь до весны или начала лета [1]. В настоящее время промысел сайры (*Cololabis*

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Фомина, Т. А., Хвостов, Д. В., Минаев, М. Ю., Утьянов, Д. А. (2025). Разработка мультиплексной ПЦР для определения видоспецифичной ДНК сайры (*Cololabis saira*) и дальневосточной сардины, иваси (*Sardinops melanostictus*). *Пищевые системы*, 8(3), 324–334. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-3-324-334>

FOR CITATION: Fomina, T. A., Khvostov, D. V., Minaev, M. Yu., Utyanov, D. A. (2025). Development of multiplex PCR for species-specific DNA determination of saury (*Cololabis saira*) and far eastern sardine, ivasi (*Sardinops melanostictus*). *Food Systems*, 8(3), 324–334. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2025-8-3-324-334>

saira) осуществляется рыболовными флотами Японии, России, Южной Кореи, Китая, Тайваня и Вануату. Российские и японские суда преимущественно ведут добычу в пределах исключительных экономических зон (200-мильной зоны), в то время как промышленные операции других стран сосредоточены в открытых водах Тихого океана.

В последние годы наблюдается устойчивое снижение уловов тихоокеанской сайры (*Cololabis saira*) российскими рыболовецкими судами. В 2020–2021 гг. объем промысла не превышал 1 тыс. тонн за путину, а в 2022 году улов отсутствовал полностью [2]. Данное сокращение связано как с общим снижением численности популяции, так и с климато-океанографическими изменениями в северо-западной части Тихого океана. В частности, зафиксировано смещение субтропических вод, включая вторую и третью ветви Кюросио, в более северные широты [3], что привело к восточному и северному сдвигу традиционных районов нагула сайры [4]. Дополнительным ограничением стала техническая неспособность большинства отечественных судов к работе в отдаленных океанических районах.

На фоне этих изменений российский флот частично переориентировался на добычу дальневосточной сардины (*Sardinops melanostictus*), массовое скопление которой с 2016 года наблюдается в водах Южных Курил. Этот вид распространен от Татарского пролива и Курильских островов до Южно-Китайского моря и характеризуется высокой экологической пластичностью. Основными экологическими детерминантами распределения сардины являются температура воды, доступность корма и условия нереста [5]. Вид проявляет выраженные сезонные миграции: зимой иваси концентрируется в Японском, Восточно-Китайском и Желтом морях, а летом перемещается в Охотское море и к восточному побережью Камчатки [6]. Дальневосточная сардина (*Sardinops melanostictus*) в силу высокой численности и широкой доступности стала одним из ключевых объектов отечественного промысла. В последние годы объемы ее вылова в России стабильно превышают добычу сайры и составляют 200–300 тыс. тонн в год. В 2020 году был установлен постсоветский рекорд — 313 тыс. тонн [7].

Замена сайры (*Cololabis saira*) на дальневосточную сардину (*Sardinops melanostictus*) может значительно снизить себестоимость продукции, что побуждает недобросовестных производителей к нарушению законодательства. В обзоре Do и Wong [8] подчеркивается, что основной движущей силой искажения маркировки морепродуктов является экономическая выгода, при этом для получения максимальной прибыли часто заменяют виды рыбы на более дешевые [8]. Такая практика не только подрывает доверие потребителей, но и создает серьезные правовые и экологические проблемы. Авторы подчеркивают необходимость совершенствования систем отслеживания и ужесточения нормативной базы для борьбы с фальсификацией [8].

В последние десятилетия наблюдается рост интереса к молекулярным методам идентификации в пищевой промышленности. Это связано с ужесточением требований к прозрачности цепочек поставок и с необходимостью быстрого подтверждения видовой принадлежности сырья [9,10]. Идентификация сайры и дальневосточной сардины (иваси) возможна только с помощью методов секвенирования специфических участков ДНК. Однако этот метод является трудозатратным, требует высокой квалификации специалистов, наличия дорогостоящего оборудования и расходных материалов. Внедрение методов секвенирования в рутинную практику российских лабораторий ограничено стоимостью реактивов и зависимостью от импортного оборудования. Альтернативой выступают методы на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), которые за последние 5 лет стали «золотым стандартом» в пищевой аутентификации.

Особое внимание уделяется аутентификации консервированной рыбной продукции из массовых промысловых видов, таких как сайра и сардина. В России сайра тихоокеанская (*Cololabis saira*) и сардина дальневосточная (иваси, *Sardinops melanostictus*) — популярное сырье для консервов. При этом до недавнего времени видовую принадлеж-

ность содержимого консервов можно было достоверно определять только путем секвенирования фрагментов ДНК, что, как отмечалось выше, является длительным и ресурсоемким процессом. Реализация ПЦР-диагностики в данном секторе могла бы заполнить эту нишу. Зарубежные работы демонстрируют, что даже в сильно переработанных продуктах (соленых, варено-копченых, в масле и пр.) методика ПЦР способна выделить и амплифицировать видоспецифичные фрагменты ДНК для идентификации вида [11]. Мультиплексный формат особенно удобен в случае консервов, содержащих смеси нескольких видов рыбы, — благодаря ему можно в одном анализе проверить присутствие сразу двух целевых видов (например, сайры и сардины). В целом, совокупность современных исследований показывает, что создание отечественных ПЦР-систем для идентификации сайры и иваси является актуальной задачей. Доступность технологий ПЦР, наличие оборудования в испытательных лабораториях (во многом унаследованного от практики тестирования ГМО) и успешный мировой опыт указывают на возможность быстрого внедрения этих методов для борьбы с фальсификацией рыбной продукции в России.

Следует отметить, что в 2019 г. в России была утверждена «Стратегия развития рыбоперерабатывающей отрасли до 2030 года»¹, где обозначена необходимость противодействия фальсификации рыбной продукции. Однако реализация этой задачи затруднена отсутствием стандартизированных методик экспресс-анализа. Разработкой доступных и надежных методов видовой идентификации, таких как ПЦР в реальном времени, позволит устранить этот пробел и усилить контроль качества. В данной статье предлагается новый подход к идентификации сайры (*Cololabis saira*) и дальневосточной сардины (иваси, *Sardinops melanostictus*) с помощью мультиплексной ПЦР-РВ. Для этого разработана система видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов «Сайра-Иваси-ВКО», позволяющая одновременно обнаруживать ДНК обоих целевых видов в одном анализе. Цель исследования — внедрить и валидировать данный метод, заполнив пробел в аналитических инструментах контроля и обеспечив отечественным испытательным лабораториям эффективный способ подтверждения вида рыбного сырья. Предлагаемая методика призвана повысить достоверность маркировки консервированной продукции из сайры и иваси, снизить долю фальсификата на рынке и тем самым приблизить отечественные практики контроля к лучшим мировым стандартам.

2. Объекты и методы

2.1. Объекты исследования

Для исследования методики на специфичность была создана контрольная панель образцов, включающая образцы ДНК генетической коллекции промысловых видов рыб Национального центра безопасности рыбной и сельскохозяйственной продукции (НЦБРС-СП). Коллекция включает образцы ДНК 90 видов рыб из 42 семейств и хранится в испытательной референс-лаборатории НЦБРС-СП. Образцы коллекции используются для идентификации и аутентификации пищевой рыбной продукции с применением методов молекулярной диагностики: секвенирование по Сенгеру, секвенирование нового поколения (NGS) и методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Подлинность образцов коллекции установлена путем секвенирования фрагментов митохондриального гена цитохрома b (Cytb) и гена 16S рибосомальной РНК (16S rRNA). Состав контрольной панели представлен в Таблице 1.

Помимо образцов контрольной панели, для валидации и апробации методики было отобрано 195 образцов пищевой рыбной продукции. Образцы разделили на несколько групп. Первая группа включала образцы сайры тихоокеанской натуральной или с добавлением

¹ Стратегия развития рыбоперерабатывающей отрасли до 2030 года. Электронный ресурс <https://fish.gov.ru/wp-content/uploads/documents/files/proekt-strategiya-2030.pdf>. Дата доступа 19.12.2025

Таблица 1. Пример приготовления модельных образцов с различным содержанием сайры и иваси

Table 1. Example of preparation of the model samples with different content of Pacific saury and ivasi

Содержание целевого компонента	Компонент	
	Навеска фарша сайры	Навеска фарша иваси
10,0 % сайры	10,0 г 100 % сайры	90,0 г 100 % иваси
1,0 % сайры	10,0 г 10,0 % сайры	90,0 г 100 % иваси
0,1 % сайры	10,0 г 1,0 % сайры	90,0 г 100 % иваси
0,01 % сайры	10,0 г 0,1 % сайры	90,0 г 100 % иваси
10,0 % иваси	90,0 г 100 % сайры	10,0 г 100 % иваси
1,0 % иваси	90,0 г 100 % сайры	10,0 г 10,0 % иваси
0,1 % иваси	90,0 г 100 % сайры	10,0 г 1,0 % иваси
0,01 % иваси	90,0 г 100 % сайры	10,0 г 0,1 % иваси

масла; вторая группа — образцы сардины (иваси) тихоокеанской натуральной или с добавлением масла; третья группа — образцы со смешанным составом: сайра тихоокеанская и сардина (иваси) тихоокеанская натуральные или с добавлением масла.

Всего для оценки специфичности был исследован 281 образец ДНК. Также для определения предела обнаружения метода (LOD) в объекты исследования были включены модельные образцы, содержащие разное процентное соотношение сайры и иваси. Модельные образцы были подготовлены следующим образом: рыбу разделяли на филе путем отделения мяса от костей, предварительно удалив голову и плавники, внутренности удаляли через разрез в брюшке, стуски крови зачищали; далее для получения однородной массы проводили гомогенизацию с использованием на ножевой мельнице Grindomix GM 200 (Retsch, Хаан, Германия), после чего смешивали в различных пропорциях согласно данным Таблицы 1. Для обеспечения равномерного распределения компонентов фарш подвергали тщательному перемешиванию. Аналогичным образом были подготовлены образцы из консервированной сайры и иваси. Все образцы хранились при температуре минус 20 °C до момента проведения испытаний.

2.2. Выделение ДНК

Экстракцию ДНК проводили из 50 мг мышечной ткани с использованием набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» (кат. № GM-503, ООО «Синтол», Россия). Набор предназначен для выделения ДНК из растительного материала, продуктов питания, пищевого сырья растительного и животного происхождения с использованием метода ЦТАБ и сорбентно-осаждающего метода выделения ДНК. Комбинация данных методов обеспечивает высокую эффективность выделения ДНК. Метод ЦТАБ (гомогенная экстракция с применением цетилтриметиламмоний бромид) был разработан в 1980 году Murray M. G. и Thompson W. F., в своей работе авторы показали, что метод ЦТАБ обеспечивает высокий выход тотальной ДНК растений при минимальном уровне ингибиторов за счет образования устойчивого комплекса ДНК с детергентом [12]. Позже Boom R. с соавторами предложил применять сорбционную методику, позволяющую эффективно выделять малые количества нуклеиновых кислот путем их осаждения на силикагелевых или диатомитовых частицах в присутствии тиоцианата гуанидина [13]. Такой комбинированный подход применяют и в настоящее время.

Из каждого образца получили 150 мкл экстракта, которые были соответствующим образом маркированы и хранились при температуре — 20 °C до последующего анализа.

2.3. Подбор праймеров для ПЦР-РВ с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО»

Для определения и идентификации ДНК сайры и иваси в качестве генетического маркера был выбран ген цитохрома b (cytb) мтДНК, который является одним из наиболее изученных митохондриальных генов и широко используемым маркером для видовой идентификации [14,15]. Для амплификации эндогенного контроля был выбран консервативный участок гена 16S рРНК мтДНК, имеющего широту определения на уровне царства животных (Animali). Подробное исследование отобранных митохондриальных ДНК-последовательностей выполняли с использованием генетической базы данных Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI), доступной в открытом режиме в сети Интернет [16]. Оценку варибельности и идентификацию консервативных регионов, необходимых для подбора праймеров, проводили посредством программы Primer-BLAST. Теоретиче-

ская проверка специфичности выбранных праймеров осуществлялась с применением интерактивного инструмента BLAST online [17]. Оценку структурно-термодинамических характеристик праймеров проводили с использованием веб-сервиса для определения физических свойств олигонуклеотидов OligoAnalyzer компании Integrated DNA Technologies [18]. Подобранные праймеры представлены в Таблице 2.

2.4. Получение положительных контрольных образцов

Для ПЦР с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» был разработан положительный контроль (ПКО сайра-иваси-ВКО), представляющий собой генно-инженерную конструкцию — плазмидный вектор pAL2-T. Этот вектор содержит целевые фрагменты ДНК сайры, дальневосточной сардины (иваси) и животных, полученные путем амплификации генов cytb и 16S rDNA. При получении продуктов амплификации перед клонированием вставки в плазмиду идентичность последовательности нуклеотидов проверяли методом секвенирования по Сенгеру. Для создания ПКО сайра-иваси-ВКО, содержащего одновременно фрагменты мтДНК сайры, дальневосточной сардины (иваси) и внутреннего контроля, смешивали плазмиды, содержащие нуклеотидные последовательности каждой из мишеней. На основе проведенных исследований по определению чувствительности с использованием рекомбинантных плазмид в качестве рабочих были выбраны концентрации: для детекции фрагмента генома сайры — $5,737 \times 10^6$ коп/мкл; для детекции фрагмента генома дальневосточной сардины (иваси) — $5,318 \times 10^6$ коп/мкл; для детекции фрагмента генома животных — $7,070 \times 10^6$ коп/мкл.

2.5. Протокол испытания

Мультиплексную ПЦР-РВ с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» проводили на амплификаторах Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), CFX 96 Touch Deep Well (BioRad, США) и QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte Ltd, Сингапур) с использованием набора реагентов для ПЦР-РВ (кат. № M-428, ООО «Синтол», Россия). Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 10 мкл 2,5× мастер-микса (включающего 2,5× ПЦР-буфер Б, SynTaq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол и Tween 20), 9 мкл смеси праймеров, 9 мкл нуклеазной воды и 2 мкл выделенной ДНК.

Термоциклирование выполняли по следующему протоколу: начальная денатурация при температуре 95 °C в течение 420 секунд, затем 35 циклов амплификации, состоящих из денатурации при 95 °C (15 секунд) и отжига/элонгации при 60 °C (40 секунд). Флуоресцентную детекцию осуществляли по трем каналам: FAM/Green (сайра), ROX/Orange (иваси) и Cy5/Red (внутренний контроль).

3. Результаты и обсуждение

В ходе экспериментальной валидации специфичности ПЦР-РВ с применением системы олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» была проведена амплификация ДНК из различных образцов рыбной продукции. Все исследуемые образцы, видовая принадлежность которых ранее была идентифицирована как сайра (*Cololabis saira*) и дальневосточная сардина (*Sardinops melanostictus*), продемонстрировали воспроизводимый положительный сигнал амплификации в соответствующих каналах детекции флуоресценции.

Дополнительно была проведена серия анализов с использованием контрольной панели ДНК, включающей широкий спектр промысловых видов рыб, млекопитающих и птиц, а также растительных компонентов. В результате амплификация специфических мишеней (сайры и иваси) была зафиксирована исключительно в целевых

Таблица 2. Дизайн праймеров для ПЦР-РВ с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО»

Table 2. Design of primers for real-time PCR with the oligonucleotide system «Saury-Ivasi-VKO»

Праймер	Наименование	Последовательность 5'-3'	Длина
<i>Cololabis saira</i>			
Прямой	Saira-F	AGTACAATGAATTTGGGGAGGTTTT	25
Обратный	Saira-R	TGGAGAAAAATAAGGTGGATTAGGG	25
Зонд	Saira-T	FAM-CGCAACTCTCACCCGGTTCTTCGCATTCC-RTQ1	29
<i>Sardinops melanostictus</i>			
Прямой	Sard.mel-F	GAAACTTTGGCTCACTCCTGGG	22
Обратный	Sard.mel-R	TAACATCACGGCAAATATGGGCG	23
Зонд	Sard.mel-T	ROX-CTATGTTTAGCAGCACAGATTTTGACAGGACTATTCC-RTQ2	37
<i>Царство Animalia</i>			
Прямой	16S All UNI-101F	CCTAGGGATAACAGCGCAATCC	22
Обратный	16S All UNI-101R	AAYAGCGGCTGCACCATTAG	20
Зонд	16S All UNI-101T	Cy5-TTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACAT-BHQ2	28

образцах, тогда как во всех остальных тестируемых образцах специфический флуоресцентный сигнал отсутствовал, что подтверждает отсутствие неспецифического связывания праймеров и высокую специфичность предложенной методики.

Графическое представление результатов амплификации показано на Рисунке 1, где отражена динамика накопления флуоресцентного сигнала при амплификации ДНК сайры и дальневосточной сардины (иваси) на амплификаторе CFX96. Эти результаты подтверждают высокую чувствительность и специфичность метода, позволяя использовать предложенный подход для достоверной идентификации видового состава рыбной продукции, включая контроль за возможной фальсификацией сырья.

Проведенное исследование экспериментальным путем показало, что в образцах сайры специфическая реакция амплификации присутствовала на канале детекции FAM/Green, Cy5/Red и одновременно отсутствовала на канале ROX/Orange. Это говорит о наличии специфического фрагмента ДНК сайры в исследуемых образцах, о прохождении ВКО и об отсутствии ингибирования. В образцах иваси специфическая реакция присутствовала на канале ROX/Orange, Cy5/Red и одновременно отсутствовала на канале FAM/Green, свидетельствуя о наличии специфического фрагмента ДНК дальневосточной сардины (иваси) в исследуемых образцах, о прохождении ВКО и об отсутствии ингибирования.

ДНК сайры и дальневосточной сардины (иваси) была идентифицирована в 100 % случаях, ложноотрицательные результаты отсутствовали.

В Таблице 3 представлены результаты оценки специфичности с использованием контрольной панели ДНК различных видов промысловых рыб, млекопитающих, птиц и растений.

Для оценки чувствительности праймеров и определения предела обнаружения (LOD) системы олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» была проведена серия экспериментов с десятикратными последовательными разведениями (от 10^{-1} до 10^{-6}) исходной ДНК сайры (*Cololabis saira*) и дальневосточной сардины (*Sardinops melanostictus*).

Каждое разведение анализировали в трех повторностях, используя стандартный протокол амплификации.

Эксперименты проводили на амплификаторе Rotor-Gene с флуоресцентной детекцией в каналах FAM/Green (ДНК сайры), ROX/Orange (ДНК иваси) и Cy5/Red (внутренний контроль, ДНК Animalia). Постепенное снижение концентрации целевой ДНК сопровождалось ожидаемым увеличением порогового цикла (Ct), вплоть до предельного значения, при котором амплификация оставалась воспроизводимой.

Результаты эксперимента, представленные на Рисунке 2 и в Таблице 4, показали, что предельное разведение, при котором ДНК целевых видов рыб могла быть надежно детектирована, составляет 1×10^{-4} . При дальнейшем снижении концентрации специфический амплификационный сигнал не регистрировался, что подтверждает высокую чувствительность метода. Эти данные свидетельствуют о возможности применения разработанной методики для детекции минимальных количеств ДНК в сложных многокомпонентных матрицах, таких как переработанная рыбная продукция, обеспечивая эффективный контроль ее видового состава и выявление возможной фальсификации.

Далее были проведены измерения концентрации ДНК в разведении 1×10^{-1} методом флуориметрии на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) с использованием набора Qubit BR для количественного определения двунитевой ДНК с диапазоном измерения 2–1000 нг. Было установлено, что чувствительность ПЦР с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» составляет: для сайры — 5,7 пкг/мкл, или 11,4 пкг/реак, или 0,01 % сайры относительно общего содержания рыбы; для иваси — 4,4 пкг/мкл, или 8,8 пкг/реак, или 0,01 % иваси относительно общего содержания рыбы.

Для оценки эффективности амплификации проанализирована зависимость порогового цикла (Ct) от логарифма концентрации ДНК. Эффективность рассчитывали по уравнению: $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$, где slope — наклон логарифмической зависимости Ct от концентрации матрицы. При идеальных условиях (100 % эффективность амплификации) slope = -3,32. В ходе серии десятикратных разведений (от 10^{-1} до 10^{-6}) с использованием приборов CFX 96, QuantStudio 5 и Rotor-Gene

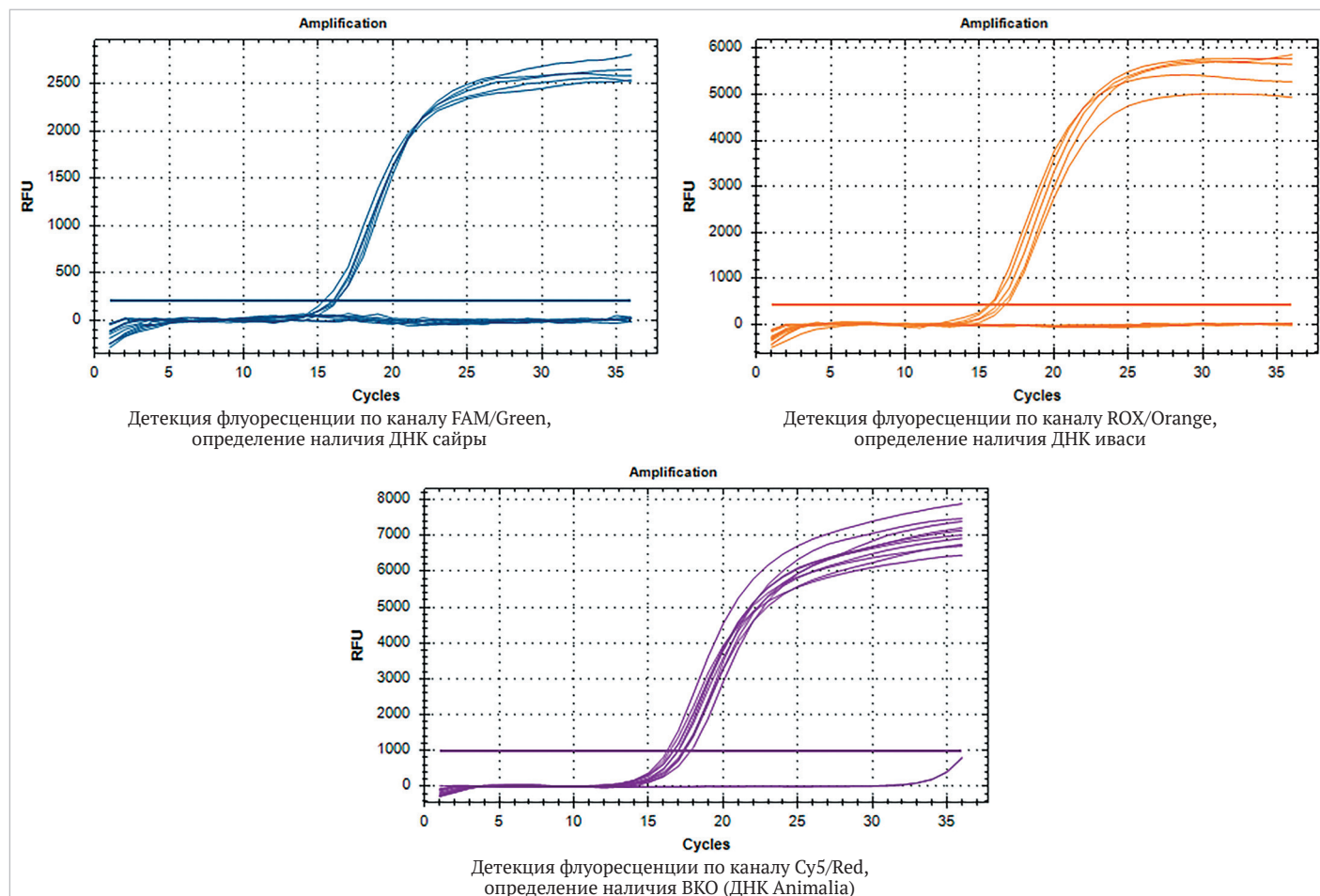


Рисунок 1. Результаты накопления флуоресцентного сигнала амплификации ДНК образцов сайры и иваси. Детекция флуоресценции по каналу FAM/Green (ДНК сайры), ROX/Orange (ДНК иваси), Cy5/Red (ДНК ВКО)
Figure 1. Results of accumulation of the fluorescent signal of DNA amplification of the samples of Pacific saury and iwasaki.
Detection of fluorescence in the channels FAM/Green (DNA of Pacific saury), ROX/Orange (DNA of iwasaki), Cy5/Red (VKO DNA)

Таблица 3. Результат исследования специфичности ПЦР с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО»
 Table 3. Results of testing the specificity of PCR with the oligonucleotide system «Sauri-Ivasi-VKO»

№ п/п	ДНК промысловых видов рыб, млекопитающих и растений	Результат амплификации по каналам:			№ п/п	ДНК промысловых видов рыб, млекопитающих и растений	Результат амплификации по каналам:		
		FAM/Green, опре- деление наличия ДНК сайры	ROX/Orange, опре- деление наличия ДНК иваси	Sy5/Red, опреде- ление наличия ВКО (ДНК Animalia)			FAM/Green, опре- деление наличия ДНК сайры	ROX/Orange, опре- деление наличия ДНК иваси	Sy5/Red, опреде- ление наличия ВКО (ДНК Animalia)
1.	Сайра (<i>Cololabis saira</i>)	+	–	+	52.	Желтополосый селар (<i>Selaroides leptolepis</i>)	–	–	+
2.	Иваси (<i>Sardinops melanostictus</i>)	–	+	+	53.	Помфрет (<i>Parastromateus niger</i>)	–	–	+
3.	Атлантическая сельдь (<i>Clupea harengus</i>)	–	–	+	54.	Индийская зубатая барабуля (<i>Parupeneus indicus</i>)	–	–	+
4.	Тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)	–	–	+	55.	Пангасиус (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)	–	–	+
5.	Салака (<i>Clupea harengus membras</i>)	–	–	+	56.	Европейский анчоус (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	–	–	+
6.	Европейский шпрот (<i>Sprattus sprattus</i>)	–	–	+	57.	Буканерский анчоус (<i>Encrasicolina punctifer</i>)	–	–	+
7.	Черноморско-каспийская тюлька (<i>Clupeonella cultriventris</i>)	–	–	+	58.	Перуанский анчоус (<i>Engraulis ringens</i>)	–	–	+
8.	Европейская сардина (<i>Sardina pilchardus</i>)	–	–	+	59.	Обыкновенный сом (<i>Silurus glanis</i>)	–	–	+
9.	Атлантическая скумбрия (<i>Scomber scombrus</i>)	–	–	+	60.	Африканский клариевый сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	–	–	+
10.	Японская скумбрия (<i>Scomber japonicus</i>)	–	–	+	61.	Мойва (<i>Mallotus villosus</i>)	–	–	+
11.	Длиннохвостый тунец (<i>Thunnus tonggol</i>)	–	–	+	62.	Морская малоротая корюшка (<i>Hypomesus japonicus</i>)	–	–	+
12.	Восточная пелагида (<i>Sarda orientalis</i>)	–	–	+	63.	Белуга (<i>Huso huso</i>)	–	–	+
13.	Желтоперый тунец (<i>Thunnus albacares</i>)	–	–	+	64.	Тюрбо, или большой ромб (<i>Scophthalmus maximus</i>)	–	–	+
14.	Макрелевый тунец (<i>Auxis thazard</i>)	–	–	+	65.	Нильская тилипия (<i>Oreochromis niloticus</i>)	–	–	+
15.	Обыкновенный тунец (<i>Thunnus thynnus</i>)	–	–	+	66.	Эсколар (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>)	–	–	+
16.	Атлантическая треска (<i>Gadus morhua</i>)	–	–	+	67.	Рувета (<i>Ruvettus pretiosus</i>)	–	–	+
17.	Тихоокеанская треска (<i>Gadus macrocephalus</i>)	–	–	+	68.	Американский стрелозубый палтус (<i>Atheresthes stomias</i>)	–	–	+
18.	Дальневосточная навага (<i>Eleginus gracilis</i>)	–	–	+	69.	Остроголовые камбалы (<i>Cleisthenes</i>) (род)	–	–	+
19.	Минтай (<i>Gadus chalcogrammus</i>)	–	–	+	70.	Тихоокеанский белокорый палтус (<i>Hippoglossus stenolepis</i>)	–	–	+
20.	Налим (<i>Lota lota</i>)	–	–	+	71.	Черный палтус (<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>)	–	–	+
21.	Сайда (<i>Pollachius virens</i>)	–	–	+	72.	Двухлинейная камбала (<i>Lepidopsetta bilineata</i>)	–	–	+
22.	Пикша (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	–	–	+	73.	Синяя зубатка (<i>Anarhichas denticulatus</i>)	–	–	+
23.	Северная путассу (<i>Micromesistius poutassou</i>)	–	–	+	74.	Макрурус (<i>Macrouridae</i>) (семейство)	–	–	+
24.	Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)	–	–	+	75.	Липарисы (<i>Liparis</i>)	–	–	+
25.	Горбуша (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	–	–	+	76.	Мерлузы (<i>Merluccius</i>) (род)	–	–	+
26.	Кета (<i>Oncorhynchus keta</i>)	–	–	+	77.	Марлин (<i>Makaira</i>) (род)	–	–	+
27.	Кижуч (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	–	–	+	78.	Полосатый копьеносец (<i>Kajikia audax</i>)	–	–	+
28.	Радужная форель (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	–	–	+	79.	Пятнистая мена (<i>Mene maculata</i>)	–	–	+
29.	Белорыбца (нельма) (<i>Stenodus leucichthys</i>)	–	–	+	80.	Обыкновенная рыба-сабля (<i>Trichiurus lepturus</i>)	–	–	+
30.	Нерка (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	–	–	+	81.	Бычок-песочник, или речной бычок (<i>Neogobius fluviatilis</i>)	–	–	+
31.	Сибирская ряпушка (<i>Coregonus sardinella</i>)	–	–	+	82.	Азиатский паралихт (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	–	–	+
32.	Зубан (<i>Dentex</i>) (род)	–	–	+	83.	Лемонема (<i>Laemonema longipes</i>)	–	–	+
33.	Лобастый зубан, зубан-философ (<i>Dentex gibbosus</i>)	–	–	+	84.	Обыкновенная ледяная рыба (<i>Champsocephalus gunnari</i>)	–	–	+
34.	Золотистый пагр (<i>Pagrus pagrus</i>)	–	–	+	85.	Конгрио (<i>Genypterus</i>) (род)	–	–	+
35.	Красный пагель (<i>Pagellus erythrinus</i>)	–	–	+	86.	Щука или обыкновенная щука (<i>Esox lucius</i>)	–	–	+
36.	Золотистый спар (дорада) (<i>Sparus aurata</i>)	–	–	+	87.	Амурская щука (<i>Esox reicherti</i>)	–	–	+
37.	Серебряный карась (<i>Carassius gibelio</i>)	–	–	+	88.	Малозубый большеглазый пентапод (<i>Gymnocranius microdon</i>)	–	–	+
38.	Плотва обыкновенная (<i>Rutilus rutilus</i>)	–	–	+	89.	Обыкновенный судак (<i>Sander lucioperca</i>)	–	–	+
39.	Толстолобики (<i>Hypophthalmichthys</i>) (род)	–	–	+	90.	Морские окуни (<i>Sebastes</i>) (род)	–	–	+
40.	Сазан (<i>Cyprinus carpio</i>)	–	–	+	91.	Гусь (<i>Anser</i>) (род)	–	–	+
41.	Пестрый толстолобик (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	–	–	+	92.	Утенок (<i>Anas</i>) (род)	–	–	+
42.	Лещ (<i>Abramis brama</i>)	–	–	+	93.	Кролик (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	–	–	+
43.	Американский речной угорь (<i>Anguilla rostrata</i>)	–	–	+	94.	Рис (<i>Oryza</i>)	–	–	–
44.	Обыкновенный речной угорь (<i>Anguilla anguilla</i>)	–	–	+	95.	Овес (<i>Avena</i>)	–	–	–
45.	Японский речной угорь (<i>Anguilla japonica</i>)	–	–	+	96.	Пшеница (<i>Triticum</i>)	–	–	–
46.	Баррамунди (<i>Lates calcarifer</i>)	–	–	+	97.	Гречиха (<i>Fagopyrum</i>)	–	–	–
47.	Малабарский групер (<i>Epinephelus malabaricus</i>)	–	–	+	98.	Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	–	–	–
48.	Малабарский групер (<i>Epinephelus malabaricus</i>)	–	–	+					
49.	Меаг (<i>Argyrosomus regius</i>)	–	–	+					
50.	Обыкновенный лаврак (сибас) (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	–	–	+					
51.	Желтохвост (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	–	–	+					

Примечание: «+» — наличие специфической реакции, целевая ДНК обнаружена; «–» — отсутствие специфической реакции, целевая ДНК отсутствует.

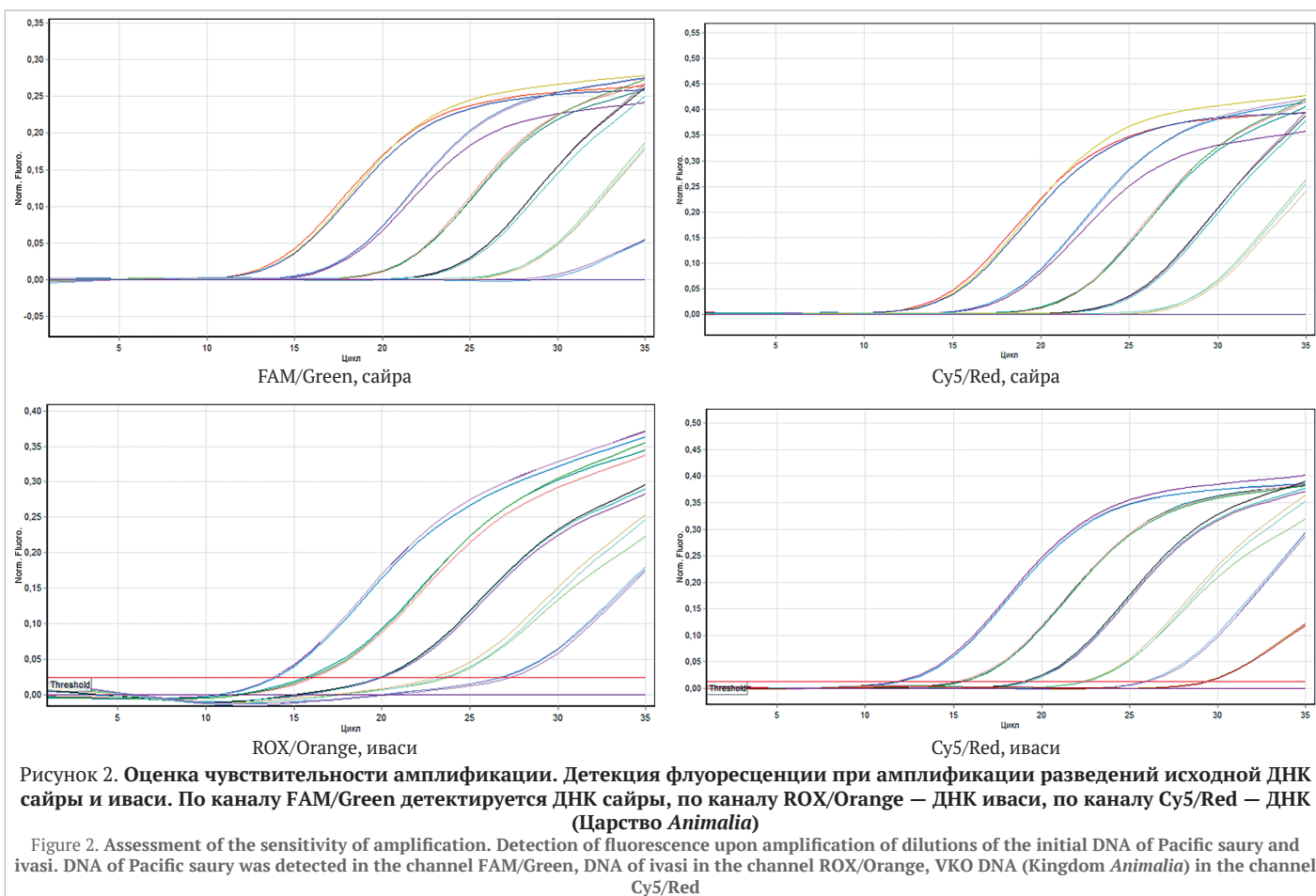


Таблица 4. Оценка чувствительности амплификации. Результаты амплификации разведений исходной ДНК сайры и иваси

Table 4. Assessment of the sensitivity of amplification. Results of amplification of dilutions of the initial DNA of Pacific saury and ivasi

Наименование образца	Результат ПЦР по каналу, Ct средняя			Результат*
	FAM/Green ДНК сайры	ROX/Orange ДНК иваси	Cy5/Red ДНК ВКО	
Сайра	12,11	—	13,49	+
Сайра 10 ⁻¹	15,59	—	16,73	+
Сайра 10 ⁻²	19,36	—	20,48	+
Сайра 10 ⁻³	22,68	—	23,71	+
Сайра 10 ⁻⁴	26,57	—	27,58	+
Сайра 10 ⁻⁵	—	—	—	—
Сайра 10 ⁻⁶	—	—	—	—
Иваси	—	13,80	13,72	+
Иваси 10 ⁻¹	—	15,89	17,06	+
Иваси 10 ⁻²	—	19,79	20,53	+
Иваси 10 ⁻³	—	23,50	23,97	+
Иваси 10 ⁻⁴	—	26,73	27,33	+
Иваси 10 ⁻⁵	—	—	—	—
Иваси 10 ⁻⁶	—	—	—	—

* Примечание: «+» — наличие специфической реакции, целевая ДНК обнаружена; «—» — отсутствие специфической реакции, целевая ДНК отсутствует.

6000 установлено, что эффективность амплификации ДНК сайры составляет 89–91,5%, ДНК дальневосточной сардины (иваси) — 93,6–99%, а внутреннего контроля (ДНК животных) — 92–98,6% в зависимости от прибора. Результаты, полученные на приборе CFX 96, представлены на Рисунке 3. Эти показатели демонстрируют высокий уровень эффективности амплификации, что подтверждает надежность методики при анализе различных образцов рыбной продукции.

При анализе предела обнаружения (LOD) установлено, что метод позволяет выявлять целевую ДНК сайры и дальневосточной сардины (иваси) в концентрациях до 0,01 % (Таблица 5), что соответствует или превосходит показатели, заявленные в других исследованиях.

Исследование пищевой рыбной продукции РВ с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» показало, что несоответствия по видовому составу были выявлены в консервах «Сайра тихоокеанская» и «Сайра тихоокеанская и сардина (иваси) тихоокеанская»,

из 155 исследованных образцов соответствовали заявленному составу 107, что составляет 69% (Таблица 6). Чаще всего в продукции отсутствовала заявленная производителем сайра, вместо нее была обнаружена дальневосточная сардина (иваси) и тихоокеанская сельдь, а также присутствовал подмес дальневосточной сардины (иваси) к сайре. В образцах консервов «Сардина (иваси) тихоокеанская» несоответствий по заявленному составу выявлено не было.

Международное сообщество активно разрабатывает меры противодействия фальсификации пищевых продуктов. В 2020 году ВОЗ подчеркнула необходимость усиления национальных систем контроля качества пищевой продукции для предотвращения и выявления угроз общественному здоровью. В рамках этой инициативы ВОЗ поддерживает государства-члены в реализации Глобальной стратегии по безопасности пищевых продуктов на 2022–2030 годы, направленной на снижение заболеваемости, связанной с пищевыми инфекциями [19].

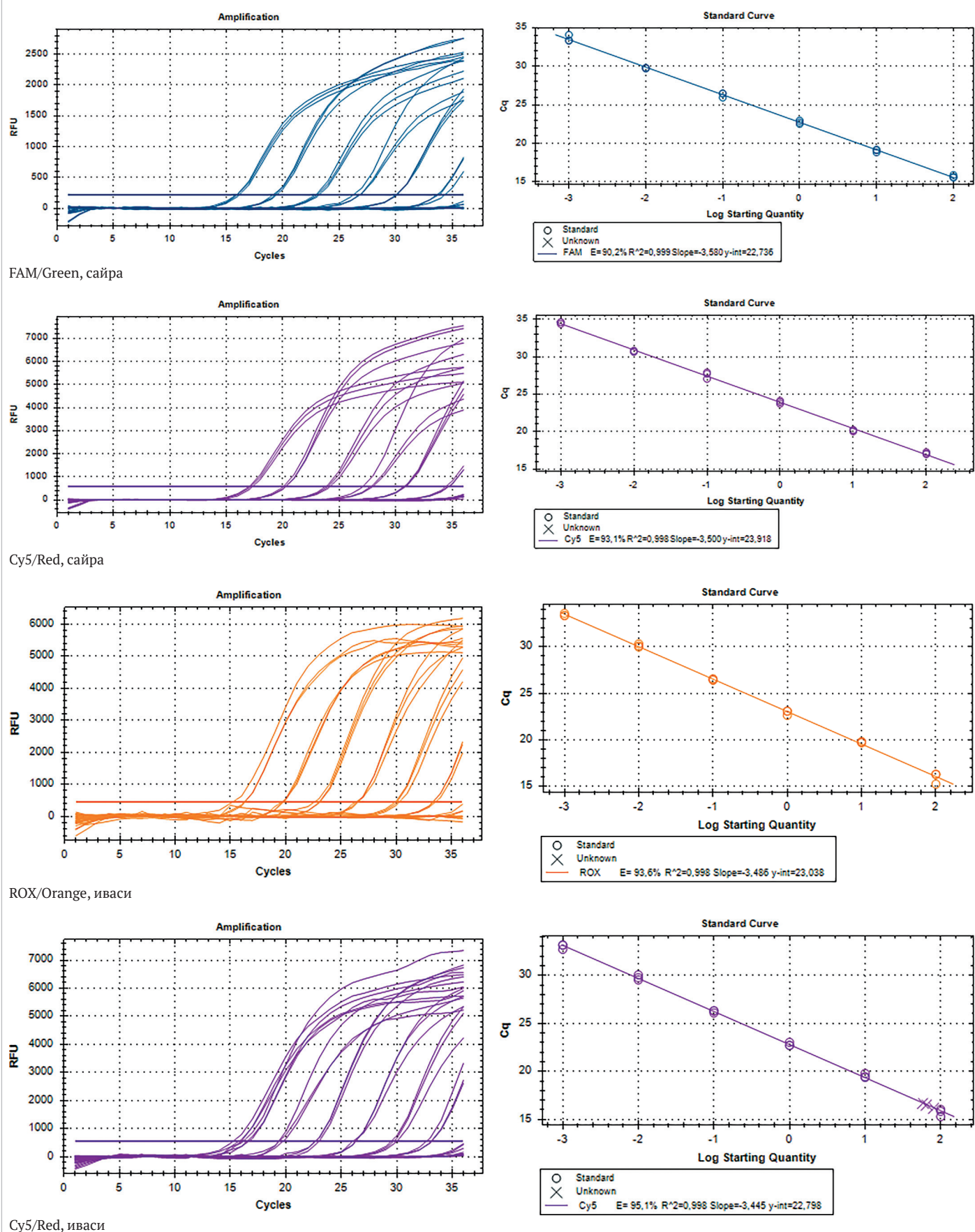


Рисунок 3. Оценка эффективности амплификации. Детекция флуоресценции при амплификации разведений исходной ДНК сайры и иваси. По каналу FAM/Green детектируется ДНК сайры, по каналу ROX/Orange — ДНК иваси, по каналу Cy5/Red — ДНК (Царство Animalia)

Figure 3. Assessment of amplification efficiency. Detection of fluorescence upon amplification of dilutions of the initial DNA of Pacific saury and ivasi. DNA of Pacific saury was detected in the channel FAM/Green, DNA of ivasi in the channel ROX/Orange, VKO DNA (Kingdom Animalia) in the channel Cy5/Red

Таблица 5. Установление предела обнаружения ПЦР с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО»
Table 5. Determination of the limit of detection of PCR with the oligonucleotide system «Sauri-Ivasi-VKO»

Содержание целевой матрицы		Результат ПЦР по каналу, Ct средняя			Результат*
		FAM/Green ДНК сайры	ROX/Orange ДНК иваси	Cy5/Red ДНК ВКО	
Сырой фарш					
Сайра	10 %	19,57	Детекцию на данном канале не проводили	17,60	+
Сайра	1 %	23,63		21,19	+
Сайра	0,1 %	27,60		24,96	+
Сайра	0,01 %	31,56		28,42	+
Иваси	10 %	Детекцию на данном канале не проводили	19,42	18,43	+
Иваси	1 %		23,42	22,07	+
Иваси	0,1 %		26,95	25,54	+
Иваси	0,01 %		30,29	29,13	+
Консервированные образцы					
Сайра	10 %	20,87	Детекцию на данном канале не проводили	19,79	+
Сайра	1 %	24,85		23,35	+
Сайра	0,1 %	29,07		26,90	+
Сайра	0,01 %	33,26		30,57	+
Иваси	10 %	Детекцию на данном канале не проводили	23,41	18,84	+
Иваси	1 %		27,28	22,36	+
Иваси	0,1 %		31,06	26,20	+
Иваси	0,01 %		34,50	29,65	+

* Примечание: «+» — наличие специфической реакции, целевая ДНК обнаружена; «–» — отсутствие специфической реакции, целевая ДНК отсутствует

Таблица 6. Результаты исследования образцов пищевой рыбной продукции из сайры и дальневосточная сардина (иваси)
Table 6. Results of the analysis of the samples of food fish products from Pacific saury and Far Eastern sardine (ivasi)

Продукция / состав	Количество исследован- ных образцов	Результаты исследования: количество образцов — видовая принадлежность состава	% выявления несоответ- ствия
Сайра тихоокеанская натуральная или с добавлением масла / Сайра	109	74 — сайра (<i>Cololabis saira</i>) 10 — сайра (<i>Cololabis saira</i>) и дальневосточная сардина (иваси) (<i>Sardinops melanostictus</i>)	32
		8 — дальневосточная сардина (иваси) (<i>Sardinops melanostictus</i>)	
		12 — тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)	
		5 — дальневосточная сардина (иваси) (<i>Sardinops melanostictus</i>) и тихоокеанская сельдь (<i>Clupea pallasii</i>)	
Сардина (иваси) тихоокеанская натуральная или с добавлением масла / Дальневосточная (тихоокеанская) сардина (иваси)	40	40 — дальневосточная сардина (иваси) (<i>Sardinops melanostictus</i>)	0
Сайра тихоокеанская и сардина (иваси) тихоокеанская натуральная или с добавлением масла / Сайра и сардина (иваси) тихоокеанские	46	33 — сайра (<i>Cololabis saira</i>) и дальневосточная сардина (иваси) (<i>Sardinops melanostictus</i>) 13 — дальневосточная сардина (иваси) (<i>Sardinops melanostictus</i>)	28

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, подтверждают высокую актуальность проблемы фальсификации рыбной продукции как на международном, так и на российском уровне. Во всем мире фиксируются многочисленные случаи замены дорогостоящих видов рыбы более дешевыми аналогами, что наносит ущерб потребителям и честным производителям. По оценкам экспертов, нелегальный оборот рыбы и фальсификация могут привести к экономическим потерям в размере \$26–50 млрд ежегодно [20]. Средний уровень несоответствия видового состава в рыбной продукции, по результатам глобальных обзоров, составляет порядка 30 % [21], хотя в отдельных выборках он может достигать 40 % и более [20]. В России проблема также актуальна: по результатам проверки Роскачества, более половины консервов сайры на рынке оказались фальсифицированными — вместо заявленной сайры содержали другую, более дешевую рыбу. В ходе анализа консервов 19 торговых марок (ТМ) «Сайра тихоокеанская (куски) натуральная с добавлением масла» только в 8 ТМ была подтверждена подлинность состава². По данным исследований, проведенных в 2021–2023 годах в испытательной референс-лаборатории ФГБУ «НЦБРСР», из 281 исследованного образца консервированной продукции из сайры в 95 образцах (более 30 %) сайра отсутствовала. Наиболее часто сайру заменяли дальневосточной сардиной, которая была выявлена в 21 % случаев (Рисунок 4).

² Роскачество. В каких консервах сайру заменяют более дешевой рыбой? Электронный ресурс: <https://rskrf.ru/tips/spetsproekty/v-kakikh-konservakh-sayru-zamenuyut-bolee-deshevoy-ryboy/> Дата доступа 13.01.2025

Данные, полученные в нашем исследовании с использованием разработанной ПЦР-тест-системы, также демонстрируют наличие несоответствий в маркировке продукции, включая случаи полной подмены одного вида другим. Сопоставление с приведенными выше независимыми источниками подтверждает, как достоверность разработанной методики, так и ее практическую значимость в условиях ограниченного лабораторного ресурса. Разработка быстрых и доступных методов видовой идентификации, таких как ПЦР-РВ, является ключевым элементом в борьбе с фальсификацией и в формировании прозрачного рынка рыбной продукции. Важно отметить, что примененная нами методика мультиплексной ПЦР-РВ продемонстрировала высокую эффективность при проверке консервированной продукции. Во-первых, метод обладает исключительной специфичностью: ни в одном из 90 образцов ДНК других видов рыб (представителей 42 семейств), использованных для валидации, не было получено ложноположительной реакции на сайру или сардину. Это означает, что разработанные праймеры и зонды гарантированно распознают только целевые виды (*Cololabis saira*, *Sardinops melanostictus*), не реагируя на посторонние ДНК. Во-вторых, система показала высокую чувствительность: установленный предел обнаружения составляет 0,01 % — метод способен зафиксировать примесь целевого вида, даже если его доля в образце не превышает одной сотой процента.

При сравнении с ранее опубликованными методами молекулярной идентификации рыбных видов, такими как секвенирование по Сенгеру [14] и баркодирование ДНК [15], предложенная методика мультиплексной ПЦР-РВ обладает рядом преимуществ. В отличие от секвенирования, которое требует значительных временных

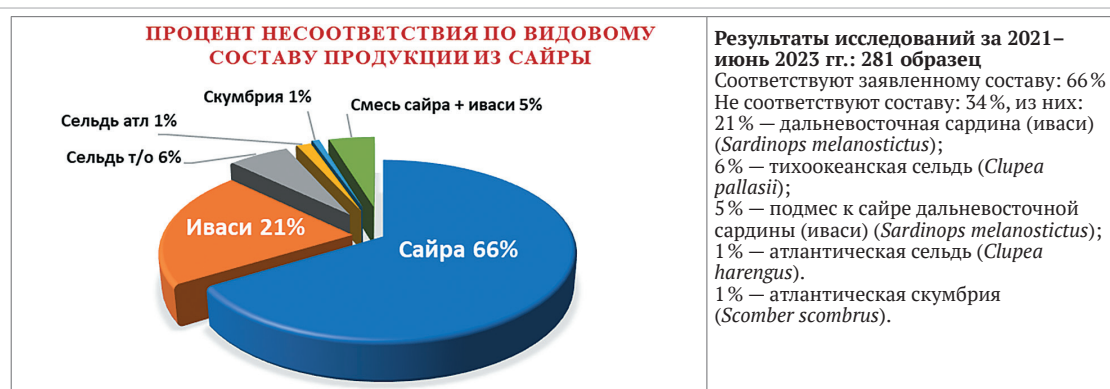


Рисунок 4. Процент несоответствия по видовому составу продукции из сайры (данные испытательной референс-лаборатории НЦБРСР)

Figure 4. Percent of nonconformity by the species composition of the products from Pacific saury (data of the test reference laboratory of NCSFAP)

и финансовых затрат, а также от сложного пост-анализа, предложенная ПЦР-РВ обеспечивает экспресс-идентификацию видов в течение 1,5–2 часов, что делает ее более применимой для рутинного контроля. По сравнению с традиционными методами баркодирования ДНК, основанными на амплификации универсальных маркеров с последующей секвенцией, предложенный метод обладает высокой специфичностью за счет использования видоспецифичных праймеров и флуоресцентных зондов. Это исключает необходимость дополнительного секвенирования и облегчает интерпретацию результатов.

Более того, в отличие от одноцелевых ПЦР-методов [15], предложенная мультиплексная система олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» позволяет одновременно детектировать несколько мишеней (сайру, иваси и внутренний контроль), что значительно повышает информативность анализа. Аналогичные подходы использовались в исследованиях Тимошкиной и соавторов [22] при идентификации осетровых видов, однако примененный ими метод имел меньшую чувствительность и не обеспечивал детекцию минимальных концентраций целевой ДНК в сложных матрицах.

Полученные нами данные согласуются с результатами зарубежных исследований, использовавших методы ПЦР и секвенирования для контроля рыбной продукции. Так, в работе Mariani и др. [23] было показано ~30% несоответствий в маркировке рыбных блюд в Европе, причем применение ДНК-анализа (секвенирование, баркод-генов) позволило точно установить вид подмены в каждом случае. Наш подход дает сопоставимый эффект: комбинированное использование мультиплексной ПЦР (как инструмента быстрого скрининга) и выборочного секвенирования (для идентификации неизвестных видов в случаях несоответствия) обеспечивает и скорость, и полноту информации о составе продукта. Аналогичную стратегию предлагают зарубежные авторы для мониторинга особо ценных видов: например, в работе Xiong и др. [24] предложено сначала проводить количественную ПЦР с видовыми пробами для выявления подмены осетровой икры, а затем подтверждать находки секвенированием для юридически значимого доказательства. Такой двухэтапный подход сочетает преимущества обеих технологий и минимизирует их недостатки.

Таким образом, обсуждаемое исследование демонстрирует, что отечественная методика ПЦР-РВ для сайры и сардины не уступает мировым аналогам по чувствительности и специфичности, а по скорости выполнения значительно превосходит традиционные подходы. Результаты проверки реальных образцов (консервов из розничной сети) показали сопоставимый с мировыми статистический уровень фальсификации (~30%) и подтвердили востребованность внедрения экспресс-анализа. Полученные данные согласуются с глобальной картиной: проблема подмены рыбной продукции имеет международный масштаб, и Россия не является исключением. Внедрение разработанного ПЦР-метода в практику контроля может заметно повысить прозрачность рынка: быстрота и экономичность тестирования создадут предпосылки для регулярного мониторинга продукции. Это отвечает современным тенденциям развития методов пищевой безопасности и рекомендациям международных организаций, призывающих усиливать научно-техническую базу для борьбы с пищевым мошенничеством [25]. В перспективе расширение панели детекции (например, добавление зондов для выявления других потенциальных примесей — сельди, скумбрии и пр.) и унификация методики на уровне государственных стандартов позволят

существенно снизить долю фальсифицированной рыбной продукции на внутреннем рынке.

На основании разработанной методики в ФГБУ «ВГНКИ» утверждены методические рекомендации «Методика определения видовой принадлежности сайры (*Cololabis saira*) и дальневосточной сардины, иваси (*Sardinops melanostictus*), на основе ПЦР с детекцией в режиме реального времени³ с системой олигонуклеотидов «САЙРА-ИВАСИ-ВКО». Особенно актуальна разработанная методика для проведения рутинных исследований контроля требований ТР ТС 022/2011⁴ «Пищевая продукция в части ее маркировки» и для выявления несоответствий по видовому составу консервированной продукции из сайры.

5. Выводы

Одной из главных причин актуальности разработанной ПЦР-методики является сходство органолептических характеристик сайры и дальневосточной сардины. Эта схожесть создает условия для их подмены в рыбной продукции, особенно в консервированной форме. Случаи фальсификации наносят ущерб добросовестным производителям, нарушают конкурентную среду и могут привести к снижению доверия потребителей. Подобные практики не только искажают рыночные отношения, но и несут риски для здоровья населения, особенно при отсутствии адекватного контроля. В этих условиях важно внедрение комплексных решений: использование цифровых платформ государственного контроля (например, ФГИС «Меркурий») в сочетании с лабораторной идентификацией состава продукции с применением ПЦР-РВ. При этом необходимо учитывать, что большинство российских испытательных лабораторий уже оснащены оборудованием для ПЦР, но не располагают валидированными методами для видовой идентификации объектов морского промысла, что ограничивает эффективность надзора.

Разработанная методика мультиплексной ПЦР-РВ с системой олигонуклеотидов «Сайра-Иваси-ВКО» продемонстрировала высокую точность, чувствительность и воспроизводимость для идентификации видового состава как в сырой рыбной продукции, так и в переработанных продуктах. Применение данного метода в испытательных лабораториях существенно сокращает время и стоимость анализа, позволяя оперативно выявлять случаи фальсификации.

Мультиплексный формат тест-системы дает возможность одновременно идентифицировать несколько видов рыб, что особенно важно для контроля подмены тихоокеанской сайры дальневосточной сардиной (иваси). Это позволяет не только выявлять нарушения маркировки продукции, но и количественно оценивать уровень подмены, что может быть использовано для разработки нормативных стандартов и для усиления контроля в пищевой промышленности.

Кроме того, разработанный метод обладает высокой адаптивностью и может быть интегрирован в существующие системы контроля качества продуктов питания. В отличие от методов секвенирования,

³ МР 24.12.2024 Методика определения видовой принадлежности сайры (*Cololabis saira*) и дальневосточной сардины, иваси (*Sardinops melanostictus*) на основе ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Утверждена 24.12.2024 г. в ФГБУ «ВГНКИ»

⁴ Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки» (с изменениями на 14 сентября 2018 года). Утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 года № 881.

требующих специализированного оборудования и сложного анализа, предложенная методика ПЦР-РВ может применяться широким кругом лабораторий без значительных затрат на дополнительное оснащение.

Таким образом, предложенная методика является надежным инструментом для обеспечения качества рыбной продукции, пре-

дотвращения фальсификации и защиты прав потребителей. Дальнейшие исследования могут быть направлены на адаптацию метода к анализу других видов рыб и морепродуктов, а также на расширение базы данных для повышения точности идентификации в сложных пищевых матрицах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Suyama, S., Shimizu, A., Isu, S., Ozawa, H., Morioka, T., Nakaya, M. et al. (2016). Determination of the spawning history of Pacific saury *Cololabis saira* from rearing experiments: Identification of post-spawning fish from histological observations of ovarian arterioles. *Fisheries Science*, 82(3), 445–457. <https://doi.org/10.1007/s12562-016-0980-1>
2. Antonenko, D. V. (2023). Russian saury fishery and factors influencing its distribution in the Northwest Pacific Ocean. *Trudy VNIRO*, 194, 108–117. (In Russian) <https://doi.org/10.36038/2307-3497-2023-194-108-117>
3. Устинова Е. И., Филатов В. Н., Чульчечков Д. Н. (5–9 сентября 2022). Изменения океанологических условий и их влияние на пространственное перемещение промысловых скоплений сайры, сардины и скумбрии в северо-западной части Тихого океана. Развитие водных транспортных магистралей в условиях глобального изменения климата на территории Российской Федерации (Евразии) («Опасные явления — IV»). Ростов-на-Дону: ЮНЦ РАН, 2022. [Ustinova, E. I., Filatov, V. N., Chulchekov, D. N. (September 5–9, 2022). *Changes in the oceanological conditions and their effect on spatial movement of commercial concentrations of Pacific saury, sardine and mackerel in the North-Western part of the Pacific Ocean*. Development of the main transport waterways under the conditions of the global climate change on the territory of the Russian federation (Eurasia) ("Hazardous phenomena — IV"). Rostov-on-Don: SSC RAS. 2022.]
4. Xing, Q., Yu, H., Liu, Y., Li, J., Tian, Y., Bakun, A. et al. (2022). Application of a fish habitat model considering mesoscale oceanographic features in evaluating climatic impact on distribution and abundance of Pacific saury (*Cololabis saira*). *Progress in Oceanography*, 201, Article 102743. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2022.102743>
5. Sarr, O., Kindong, R., Tian, S. (2021). Knowledge on the Biological and Fisheries Aspects of the Japanese Sardine, *Sardinops melanostictus* (Schlegel, 1846). *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(12), Article 1403. <https://doi.org/10.3390/jmse9121403>
6. Takasuka, A., Oozeki, Y., Kubota, H., Lluch-Cota, S. E. (2008). Contrasting spawning temperature optima: Why are anchovy and sardine regime shifts synchronous across the North Pacific? *Progress in Oceanography*, 77(2–3), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2008.03.008>
7. Do, T. D., Wong, L. L. (2025). The investigation of seafood mislabeling in Asia: A review and coping strategies. *Journal of Agriculture and Food Research*, Article 101702. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101702>
8. Лобачев, Д. (2023). И все-таки она сардина. Что за рыба иваси и с чем ее едят. Электронный ресурс: <https://tass.ru/obschestvo/18253477> Дата доступа 12.05. 2025. [Lobachev, D. (2023). And yet it is sardine. What kind of fish is ivasi and what it is eaten with. Retrieved from <https://tass.ru/obschestvo/18253477> Accessed May 12, 2025. (In Russian)]
9. Fanelli, V., Mascio, I., Miazzi, M. M., Savoia, M. A., De Giovanni, C., Montemurro, C. (2021). Molecular approaches to agri-food traceability and authentication: An updated review. *Foods*, 10(7), Article 1644. <https://doi.org/10.3390/foods10071644>
10. Galimberti, A., Casiraghi, M., Bruni, I., Guzzetti, L., Cortis, P., Berterame, N. M. et al. (2019). From DNA barcoding to personalized nutrition: The evolution of food traceability. *Current Opinion in Food Science*, 28, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.008>
11. Armani, A., Castiglioglio, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2012). Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of *Bianchetto* (juvenile *Sardina pilchardus*), *Rossetto* (*Aphia minuta*), and icefish in fresh, marinated and cooked products. *Food Chemistry*, 133(1), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.076>
12. Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
13. Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-Van Dillen, P. M., Van Der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
14. Cutarelli, A., Galiero, G., Capuano, F., Corrado, F. (2018). Species identification by means of mitochondrial cytochrome b DNA sequencing in processed anchovy, sardine and tuna products. *Food and Nutrition Sciences*, 9(4), 369–375. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.94029>
15. Ramos, A., Santos, C., Mateiu, L., Gonzalez, M. del M., Alvarez, L., Azevedo, L. et al. (2013). Frequency and pattern of heteroplasmy in the complete human mitochondrial genome. *PLoS ONE*, 8(10), Article e74636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074636>
16. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Accessed June 13, 2025.
17. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Retrieved from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Accessed June 13, 2025.
18. Integrated DNA Technologies. Web service for determining the physical properties of oligonucleotides OligoAnalyzer. Retrieved from <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> Accessed June 13, 2025.
19. WHO. (2022). WHO global strategy for food safety 2022–2030: Towards stronger food safety systems and global cooperation. Geneva 27, Switzerland, 2022.
20. Revealed: Seafood fraud happening on a vast global scale. Retrieved from <https://www.theguardian.com/environment/2021/mar/15/revealed-seafood-happening-on-a-vast-global-scale> Accessed June 13, 2025.
21. Luque, G. M., Donlan, C. J. (2019). The characterization of seafood mislabeling: A global meta-analysis. *Biological Conservation*, 236, 556–570. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.04.006>
22. Timoshkina, N. N., Vodolazhskii, D. I., Usatov, A. V. (2011). Molecular-genetic markers in studies of intra- and interspecies polymorphism in sturgeon (acipenseriformes). *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 1(2), 160–171. <https://doi.org/10.1134/S2079059711020122>
23. Mariani, S., Griffiths, A. M., Velasco, A., Kappel, K., Jérôme, M., Perez-Martin, R. I. et al. (2015). Low mislabeling rates indicate marked improvements in European seafood market operations. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13(10), 536–540. <https://doi.org/10.1890/150119>
24. Xiong, X., Yuan, F., Huang, M., Cao, M., Xiong, X. (2020). Development of a rapid method for codfish identification in processed fish products based on SYBR Green real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1843–1850. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14446>
25. Seafood Fraud Becoming a Costly Global Concern. Retrieved from <https://foodinstitute.com/focus/seafood-fraud-becoming-a-costly-global-concern> Accessed June 13, 2025.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Фомина Татьяна Алексеевна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Начальник отдела молекулярно-диагностических исследований испытательной референс-лаборатории, Национальный центр безопасности рыбной и сельскохозяйственной продукции 129626, Москва, Графский переулок, 14–1 E-mail: fomina1032@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8848-0632	Tatyana A. Fomina, Candidate of Technical Sciences, Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhin str., 109316, Moscow, Russia Head of the Department of Molecular Diagnostic Research at the Testing Reference Laboratory, Nation Center for Fish and Agricultural Product Safety 14–1, Gafskiy per., 129626, Moscow, Russia E-mail: fomina1032@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8848-0632
Хвостов Даниил Владиславович — кандидат технических наук, научный сотрудник, лаборатория «Молекулярной биологии и биоинформатики», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 E-mail: d.hvostov@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-3445-4559 * автор для контактов	Daniil V. Khvostov, Candidate of Technical Sciences, Scientific Worker, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhin str., 109316, Moscow, Russia E-mail: d.hvostov@fncps.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-3445-4559 * corresponding author
Минаев Михаил Юрьевич — кандидат технических наук, руководитель лаборатории Молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 E-mail: m.minaev@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0038-9744	Mikhail Yu. Minaev, Candidate of Technical Sciences, Head of Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhin str., 109316, Moscow, Russia E-mail: m.minaev@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0038-9744
Утьянов Дмитрий Александрович — кандидат технических наук, научный сотрудник, лаборатория «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 E-mail: d.utyantov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7693-3032	Dmitry A. Utyanov, Candidate of Technical Sciences, Scientific Worker, Laboratory of Scientific and Methodical Work, Biological and Analytical Research, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhin str., 109316, Moscow, Russia E-mail: d.utyantov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7693-3032
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	The authors are equally involved in writing the manuscript and are equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.