



Research Paper

<https://doi.org/10.5564/pib.v39i2.3325>

PROCEEDINGS OF
PIB
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

Study on methods for the identification of cattle-derived components in milk and dairy products

MUQILE¹, Gun-Aajav BAYARMAA^{2*} 

¹*Xilin Gol Vocational College, Xilin Gol Institute of BioEngineering, Xilinhote, Inner Mongolia, 02600, China*

²*Department of Biology, School of Arts and Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar 14201, Mongolia*

*Corresponding author: g.bayarmaa@num.edu.mn, <https://orcid.org/0000-0001-6550-657X>

Abstract. With the increase in the adulteration and fraudulent practices involving animal-derived products, such as agricultural products, food, and feed, and the potential risk of transmission of animal-derived diseases, the qualitative and quantitative detection technology of animal-derived ingredients has become a research hotspot as an efficient detection method to ensure food safety and protect the rights and interests of consumers. Comparing and analyzing the complete mitochondrial genome sequences of ten animals, cattle specific primers and probe were designed for the identification of cattle derived components using real-time PCR. The results showed that the pair of primers and probe developed for the detection of cattle components were highly specific and sensitive as they were able to identify as low as 1 picogram of DNA. The results obtained from the quantitative detection of cattle origin in beef products demonstrate that the method exhibits a strong capability for accurate quantitative detection.

Keywords: cattle origin ingredients; cattle specific primer; probe; TaqMan

Received 22 March 2023; received in revised form 30 August 2023; accepted 02 November 2023

© 2023 Author(s). This is an open access article under the [CC BY-NC 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Introduction

Dairy products, also known as cream products, is the use of cow's milk or sheep's milk as the main raw materials, adding the proper amount of vitamins, minerals, and other auxiliary materials, and processing them in an accordance with applicable laws, regulations and standards [1]. Milk and dairy products are essential basic food for humans. Consumers like them because of their high nutritional value, pleasant flavor, and ability to boost the immune system [2]. In recent years, sheep milk [3], [4], goat milk [5], [6], buffalo milk [7], [8], yak milk [9], [10], horse milk [11], [12], donkey milk [13], [14], and camel milk [15], [16] are becoming popular among consumers because of their high nutritional value, distinct flavor, and wide range of useful elements. Specialty milk, such as yak and camel milk, is more than ten times more expensive than cow milk because of its limited production area and output, as well as the high consumer demand. The price difference of milk and dairy products from different animal sources encourages producers and illegal traders to adulterate low-priced milk and dairy products into high-priced specialty milk

and dairy products, which not only disrupts the fair trade market but also infringe the rights and interests of consumers, and even poses a potential threat to the health of consumers.

Given the prevalence of milk and dairy product fraud and adulteration, it is crucial to have access to technologies that accurately identify the animal species from which milk and dairy products were produced [17], [18]. At present, methods for detecting components derived from animals are based on the detection and analysis of specific proteins and DNA in samples. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis, chromatography and mass spectrometry represent some of the techniques applied. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) stands out among other technologies due to its high throughput, high efficiency, specificity and sensitivity. In their study, Iijima *et al.* [19] developed a method for identifying the source of animal and plant components in food by sequencing the 18S rRNA gene. Girish *et al.* [20] developed a method for identifying animal-derived components by sequencing the mitochondrial 12S rRNA

gene. Arya *et al.* [21] developed a TaqMan real-time PCR-based technique for the qualitative and quantitative detection of pig components in mixed meat samples.

In this study, comparing the complete mitochondrial genome sequences of sheep, cattle, yak, buffalo, pig, chicken, duck, horse, rabbit, and geese, a combination of cattle-specific primers and probe were designed to detect cattle derived components qualitatively and quantitatively. A method was developed for the identification of animal-derived ingredients, specifically for the inspection and detection of dairy products and beef, based on the provided primers and probe.

Materials and methods

Milk and cream samples were purchased at the local farmer’s market in Xilinhot City, and directly used for experiments. Meat samples were purchased at the local farmer’s market in Xilinhot, and from herdsman.

Treatment of milk and dairy products

A total volume of 100 milliliters of milk and 100 milligrams of cream samples were centrifuged for 10 min at 4°C and 4800 g. Following centrifugation, the supernatant was discarded, and the pellet was washed with 30 milliliters of phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged as described above. PBS (30ml) and emulsifying agent OP(10ml) were added to the precipitate and incubated at 4°C for 10 min and centrifuged for 10 min at 4°C and 4800 g and the precipitate is stored at 4°C.

Genomic DNA extraction

The DNA from the pre-processed milk and cream was extracted by the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method as follows: 800 µl of CTAB buffer (1% CTAB, 50 mM Tris, 13.5 mM Na₂EDTA, 0.7 M NaCl, pH 8.0) was added to about 50 µl sample, mixed by vortexing, and incubated at 65 °C for 30 min. After centrifugation at 13000 rpm for 5 min, the supernatant was transferred to a clean centrifuge tube, and an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) was added, mixed thoroughly, and centrifuged at 13000 rpm for 5 min. The same volume of isopropanol was added to the supernatant, mixed well, and centrifuged at 13000 rpm for 5 min. The pellet was washed with 75%

ethanol, air-dried and redissolved in ddH₂O. The DNA concentration and quality were evaluated by a 2000c NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher, USA) and agarose gel electrophoresis. DNA was diluted to a concentration of approximately 100 ng/µl. MagAttract HMW DNA kit (QIAGEN) and TaKaRa MiniBest Universal Genomic DNA isolation kit were used for genomic DNA extraction according to the user’s guide. Genomic DNA from meat tissue samples was isolated using TaKaRa MiniBest Universal Genomic DNA isolation kit. For agarose gel electrophoresis, Trans 15K DNA Marker (Beijing Quanshi Gold Biotechnology Co, LTD) and approximately 600 ng of each sample were loaded to 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide for 10 min, the gel was visualized with an imaging analyzer (Thermo Fisher, USA).

Primers and probes

The oligonucleotide primers and probes applied in this study were designed to amplify and detect the mitochondrial rRNA gene of bovine (*Bos taurus*). The selected gene sequences used for the primers and probes were selected based on the alignments of available sequences deposited in GenBank and the primers and probe were designed using Primer Premier software, synthesized by Ruibiotech Company (Beijing, China). A software-tool BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) of NCBI (National Center for Biotechnology Information) was applied to evaluate the specificity of the primers and probes. The cattle-specific probe was labeled with HEX at the 5’end and BHQ at the 3’end. The cattle-derived primers and probe were designed using the mitochondrial rRNA gene sequence of *Bos taurus* (LC745718.1 and LC745515.1) as the template (**Fig. 1**). The primer and probe sequences are shown in **Table 1**.

Real-time PCR

Real-time PCR was carried out in total 20 µl volume: TransStart qPCR SU-Premix 2 µl, cow forward primer (10 µM) 1.0 µl, cow reverse primer (10 µM) 1.0 µl, probe (10 µM) 1.0 µl, DNA (100 ng/µl) 1.0 µl. Reaction conditions were: pre-denaturation at 94°C for 30 sec, denaturation at 94°C for 5 sec, extension at 60°C for 31 sec, 40 cycles.

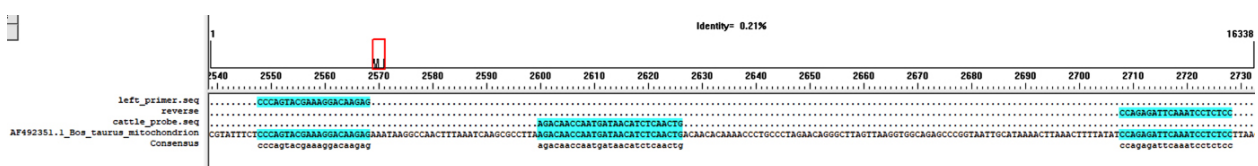


Fig. 1. The cattle-derived primers and probes position on *Bos taurus* mitochondrial genome.

Table 1. Primer and probe sequences

	Sequence 5' → 3'
Cattle forward primer	CCCAGTACGAAAGGACAAGAG
Cattle reverse primer	GGAGAGGATTTGAATCTCTGG
Cattle probe	^a HEX-AGACAACCAATGATAACATCT-CAACTG- ^b BHQ ₂

Note: ^aHEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein, ^bBHQ₂, black hole quench group

Detection limit and quantitative analysis

The milk and cream DNA extracted by three different methods were diluted in gradient with ddH₂O, 10 times for each dilution, and 5 times in total. The diluted concentrations were 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0.1 ng/μl, 0.01 ng/μl, 0.001 ng/μl, respectively. Real-time fluorescent PCR was used to amplify the DNA of six samples with different dilution gradients. The standard curve was established by Ct method, and the effect was enhanced by expansion. Effective DNA quality was evaluated.

Data processing

Amplification curves and Ct values were analyzed by using the software of 7300Plus real-time PCR amplification (ABI, USA). Three parallel tests were performed for each test, and the results were expressed as mean ± standard deviation.

Results

The concentration and purity of the sample’s DNA

The CTAB method, the TaKaRa kit method, and the MagAttract kit method were used to extract DNA from milk and cream. The concentration of DNA extracted from milk and cream using the three methods can reach 100 ng/μl (Table 2). Milk DNA extracted using the CTAB method or the TaKaRa kit yielded an A₂₆₀/A₂₈₀ ratio close to 1.8, indicating high DNA purity. The MagAttract kit approach yields milk DNA with an A₂₆₀/A₂₈₀ ratio of roughly 1.6. These three techniques produce DNA with good concentration and purity from

milk and cream. Protein contamination of the DNA extracted using the TaKaRa and the MagAttract kit method suggests that the silica gel adsorption column and magnetic beads can adsorb protein and fat. The DNA of different samples (milk and cream) using the same methodology displayed varying degrees of purity, indicating that cream contained more protein and fat than milk, which led to increased adsorption of the silica gel adsorption column and magnetic beads, and decreased A₂₆₀/A₂₈₀ ratio.

Agarose gel electrophoresis was used to analyze the DNA of the extracted samples to evaluate the degradation of DNA extracted using the three methods. As shown in Figure 2A, milk and cream DNA extracted by the CTAB method had been completely degraded, and there was no obvious genomic DNA band in the corresponding electrophoresis lane. As shown in Figure 2B, milk and cream DNA extracted by the TaKaRa method were partially degraded, and milk DNA extracted by the MagAttract kit (Figure 2C) method has good integrity (no degradation). Cream DNA extracted by the MagAttract kit method has good integrity (a little degradation). The milk DNA band extracted by the MagAttract kit method is single, clear and bright, without trailing and the degradation phenomenon, which indicates that the DNA is of high purity and good integrity. From the electrophoresis lane of cream, it can be seen that cream DNA extracted by CTAB method has no obvious band, cream DNA extracted by TaKaRa kit method have a serious trailing phenomenon, and DNA

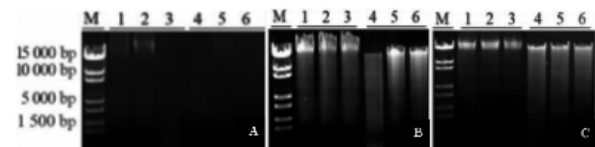


Fig. 2. Electrophoretic detection pattern of milk and cream DNA by CTAB method (A), TaKaRa kit (B), and MagAttract kit (C). M is Trans 15K DNA Marker; Lane 1-3: milk 1-milk 3; lane 4-6: cream 1-cream 3.

Table 2. Concentration and purity of milk and cream DNA

Sample	CTAB		TakaRa kit		MagAttract kit	
	DNA (ng/μl)	A _{260/280}	DNA (ng/μl)	A _{260/280}	DNA (ng/μl)	A _{260/280}
Milk 1	112.6	1.83	78.4	1.83	106.7	1.64
Milk 2	118.5	1.84	127.9	1.84	99.6	1.63
Milk 3	116.4	1.82	125.1	1.83	105.2	1.66
Cream1	122.3	2.03	115.6	1.24	118.7	1.54
Cream 2	117.4	1.95	89.5	1.27	123.6	1.50
Cream 3	120.4	1.98	120.4	1.25	120.4	1.56

extracted by MagAttract method has an obvious band but is accompanied by a slight degradation. According to the above test results, among the three DNA extraction methods for the same sample, the MagAttract kit method has the better extraction effect.

Real-time PCR Detection of cattle-derived components

Using cattle-specific primers and probes, the genomic DNA of milk, cream and meat from six cattle samples was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (TaqMan probe method) using a diluent as the template. Figure 3 shows that typical amplification curves were observed in the cattle milk, cream (Figure 3A) and meat (Figure 3B) samples, no such curves were observed in the milk samples of the other four different animals or the muscle tissues of seven different animal species. The Ct values of the cow milk, cream and meat samples detected by real-time PCR are shown in Table 3. The Ct values of milk, cream and meat samples (six samples, each tested three times in parallel) were all greater than 0 and less than 35, indicating that the origin of the samples was consistent with animal origin. According to the national animal origin testing standard (SN/T2051-2008 “Detection of Cattle, Sheep and Pig Origin Ingredients in Food, Cosmetics and Feed, Industry Standard for Entry-Exit Inspection and Quarantine of the People’s Republic of China”) and the results of previous research [6], when the Ct value of the sample is not 0 and less than 35 when there is a typical amplification curve, the sample is determined to be the corresponding origin. The Ct values for the milk DNA of the four animals (sheep, mare, buffalo, and camel) and the muscle genomic DNA of the seven animals (pig, sheep, horse, chicken, duck, rabbit, and goose) were recorded as 0. This indicates that the samples do not originate from bovine sources. The results obtained from this study demonstrate that the identification method utilizing the developed primers

Table 3. The evaluation of extraction of DNA and Ct values from samples of cattle milk, cream, beef and samples of non-cattle origin

Sample	DNA (ng / μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Ct value
Milk 1	103.7	1.64	16.19 ± 0.84
Milk 2	99.6	1.62	21.52 ± 0.58
Milk 3	105.1	1.66	25.38 ± 0.35
Cream 1	118.7	1.54	29.95 ± 0.42
Cream 2	123.6	1.50	33.13 ± 0.29
Cream 3	120.4	1.55	35.59 ± 0.40
Cattle meat 1	103.2	1.87	13.23 ± 0.04
Cattle meat 2	108.2	1.89	14.33 ± 0.14
Cattle meat 3	108.2	1.87	14.33 ± 0.04
Cattle meat 4	106.5	1.86	13.33 ± 0.03
Cattle meat 5	103.2	1.87	13.23 ± 0.04
Sheep milk	119.4	1.87	-
Mare milk	110.1	1.92	-
Buffalo milk	111.9	1.78	-
Camel milk	119.7	1.88	-
Pork	129.1	1.89	-
Mutton	116.4	1.87	-
Horse meat	121.1	1.89	-
Chicken	105.9	1.88	-
Duck meat	122.7	1.90	-
Rabbit meat	109.4	1.86	-
Goose meat	102.8	1.84	-

Note: - no detection.

and probe is highly effective in detecting bovine-derived components in milk and cream. Furthermore, the muscle tissue of the examined animals did not exhibit any presence of components derived from cattle. These findings indicate that the identification method exhibits a high level of specificity.

The genomic DNA of milk was diluted 10¹-10⁷ times by a gradient of 10 for the detection sensitivity test of

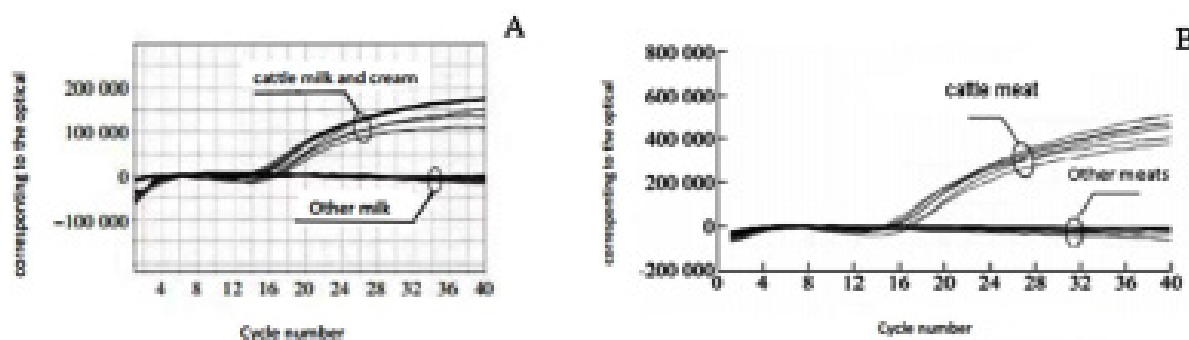


Fig. 3. The identification of cattle-derived materials in cattle milk, cream and meat samples; milk and cream (A), meat tissue (B) samples of cattle origin inferred from TaqMan real-time PCR.

cattle derived components. As can be seen from Figure 4 cattle genomic DNA solution (100.000 00 ng), diluted 10¹ times (10.000 00 ng), diluted 10² times (1.000 00 ng), diluted 10³ times (0.100 00 ng), diluted 10⁴ times (0.010 00 ng) and diluted 10⁵ times (0.001 00 ng) showed a typical amplification curve, and the amplification curve shifted to the right with the increase of dilution. No typical amplification curve was observed at 10⁶ dilutions (0. 000 10 ng) and 10⁷ dilutions (0. 000 01 ng). The Ct values of the diluted template for animal origin detection by real-time PCR are shown in Table 4. DNA solution (100. 000 ng), diluted 10¹ times (10. 000 00 ng), diluted 10² times (1. 000 00 ng), diluted 10³ times (0. 100 00 ng), diluted 10⁴ times (0 001 ng), the Ct value of 10⁵ times dilution (0. 00001 ng) was not 0 and less than 35, and the Ct value gradually increased with the dilution of the template. When the genomic DNA of cattle milk and cream was diluted to 10⁶ and 10⁷ times, the Ct value was 0. The results mentioned above indicate that the application of self-designed primers and probes specific to cattle DNA enables the successful detection of 0.001 ng of cattle DNA, exhibiting a high level of sensitivity at 1 pg.

Quantitative detection of cattle derived components

Standard curves for milk and cream genomes were used to quantify the content of cattle ingredients in dairy products. Six cattle DNA template mass concentration trapezoidal plots were used to detect cattle-derived curves for quantitative detection of cattle derived components were drawn (Table 5). According to the corresponding Ct value and standard curve equation of cattle creams, the quantitative detection results of cattle derived components in milk and creams can be calculated. Real-time PCR was used to detect processed meat products (beef jerky), and the corresponding mass concentration calculated from the standard curve for quantitative detection of cattle derived components was in good agreement with the actual mass concentration

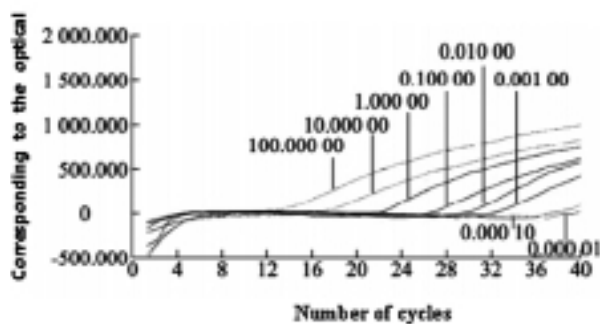


Fig 4. Simplex real-time PCR amplification plots for the sensitivity of authentication of cattle milk

Table 4. Detection limit results of cattle milk and cream DNA

Concentration	Ct value	
	MagAttract kit method	
	Milk	Cream
100	16.73 ± 0.40	16.15 ± 0.85
10	21.30 ± 0.13	21.24 ± 0.39
1	23.81 ± 0.17	25.38 ± 0.24
0.1	27.73 ± 0.29	29.95 ± 0.32
0.01	30.21 ± 0.13	33.23 ± 0.19
0.001	34.45 ± 0.30	35.47 ± 0.40
0.0001	-	-
0.00001	-	-

Note: - no detection.

Table 5. Slope, amplification efficiency and correlation coefficient of cattle milk and cream standard curve (R²)

Test item	Ct value	
	Milk	Cream
Cream standard curve (R ²)	0.9949	0.9993
Slope coefficient	-3.363	-3.55
Amplification efficiency (%)	98.31	91.16

Table 6. The quantification of beef in the meat product

Sample	Ct value	Detected mass concentration (ng/ml)
Beef jerky	15.47	262.03
	15.31	307.03
	15.92	207.93
	15.74	217.78
	15.39	276.42

value (50 ng/μl) (Table 6). The above results indicate that the primers and probe that were designed could be used for the identification of bovine origin components in milk and dairy products, and had quantitative detection ability.

Discussion

The application of real-time PCR technology in the detection of animal derived components in food has emerged as a valuable tool for food regulatory authorities. This technology offers a scientific and efficient method for enhancing food safety management and addressing the issue of fraudulent practices in the milk market. This is particularly important considering the limitations of standard PCR, which is time-consuming, has low throughput. The utilization of real-time polymerase chain reaction (PCR) employing the dye technique for the identification of animal derived components has been widely developed. In recent years, there has been a

gradual growth in the utilization of TaqMan probe-based technologies for the identification of animal derived components in various applications. The functionality of this technology is contingent upon the utilization of samples of high-quality and relies on the use of specific primers and probes. When comparing the dye approach to the TaqMan probe-based method in real-time PCR technology, it is evident that the latter demonstrates a greater level of specificity.

The study has successfully developed a real-time fluorescence quantitative PCR method that demonstrates rapid, accurate, and stable detection of animal components. This method exhibits high specificity and sensitivity. The detection limit of milk components in goat milk was found to be 0.5% higher compared to the study conducted by Lopez-Calleja *et al.* [22], which utilized the bovine 12S rRNA gene as the target gene. Additionally, it was observed to be 1% higher than the detection limit reported by Ren Yijie *et al.* [23], who employed primers and probes to detect bovine origin in mixed milk. The sensitivity limit of detecting bovine origin in meat and meat products using primers and probes was found to be 0.035 ng higher than the limit reported by Zhang *et al.* [24]. Furthermore, the primers and probes formulated in this study effectively identified the origin of beef in commercially accessible beef sausages, aligning with the ingredients specified in the product demonstrating the uniqueness, high sensitivity, and broad applicability of the method.

Conclusion

The efficacy of real-time PCR was demonstrated by designing cattle-specific probes through a comparative analysis of the nucleotide sequence of the rRNA gene in the mitochondrial genome.

The appropriate ratio of each forward and reverse primer and specific probe used in the study sample was 1 ng to 1 ng. Based on the sensitivity test results, it was determined that the method has the potential to detect 1 picogram (pg) of bovine DNA template.

A rapid, accurate, and stable real-time PCR method was developed for the detection of bovine components using a single bovine-specific probe.

References

[1] L. C. Liao, "Development of dairy products and HACCP System Certification of dairy products," Food Safety Guide, vol. 21, pp. 61-62, 2017.

[2] J. L. Liu, "Development of polymerase chain reaction-based techniques to detect adulteration

of goat milk with bovine milk," Xi 'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2018.

- [3] W. Y. Quan, H. L. Xia, S. Gang, "Nutritional and Therapeutic Properties of Goat Milk," Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, vol. 29, no. 1, pp. 66-67, 2010.
- [4] Y. B. Wang, S. Xu, Y. M. Hou, "Research progress on the Nutritional Composition of Goat Milk," Chinese Journal of Food and Nutrition, vol. 18 no. 10, pp 67-71, 2012.
- [5] T. Chen *et al.*, "Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk," BMC Microbiology, vol. 20, no. 1, Jul. 2020, <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01920-6>.
- [6] A. Nudda *et al.*, "Effects of nutrition on main components of sheep milk," Small Ruminant Research, vol. 184, p. 106015, Mar. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.11.001>.
- [7] J. H. Dai *et al.*, "Research progress on nutrition and function of buffalo milk," Chinese Dairy Cows, vol. 6, pp. 10-13, 2017.
- [8] Q. Y. Li *et al.*, "Research progress on components and functional properties of buffalo milk," Food Science, vol. 32, no. 3, pp. 305-309, 2011.
- [9] F. Yang, Z. Luo, X. Shen, C. Liu, W.-Y. Huang, and S. Shuguo, "Study on Nutrition, Flavor Characteristics and Antioxidant Activity of Yak Milk Dregs at Different Elevations in Tibet," Science and Technology of Food Industry, vol. 42, no. 11, pp. 81–88, Jun. 2021, <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090265>.
- [10] J. Zhang, M. Yang, D. Cai, Y. Hao, Z. Yang, "Composition coagulation characteristics and cheese making capacity of yak milk," Journal of Dairy Science, vol. 103, no. 2, pp. 1276-1288, 2020.
- [11] G. Liang *et al.*, "Study of bacterial and fungal community structures in traditional koumiss from Inner Mongolia," Journal of Dairy Science, vol. 102, no. 3, pp. 1972-1984, 2019.
- [12] L. Guo *et al.*, "Production technology, nutritional, and microbiological investigation of traditionally fermented mare milk (Chigee) from Xilin Gol in China," Food Science and Nutrition, vol. 8, no. 1, pp. 257–264, Dec. 2019, <https://doi.org/10.1002/fsn3.1298>.
- [13] Z. Wenwen *et al.*, "Chemical nutrients and bioactivity of donkey milk," Journal of Food Safety and Quality Inspection, vol. 8, no. 12, pp. 4574-4581, 2017.
- [14] Y. Y. Liu *et al.*, "Determination of physical and

- chemical properties and microorganisms in fresh donkey milk,” *Xinjiang Animal Husbandry*, vol. 32, no. 11, pp. 50-51, 2017.
- [15] F. Benmeziane – Derradji, “Evaluation of camel milk: gross composition—a scientific overview,” *Tropical Animal Health and Production*, vol. 53, no. 2, p. 308, May 2021, <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02689-0>.
- [16] G. Liang *et al.*, “Comparative study of physicochemical composition and microbial community of khoormog, chigee, and airag, traditionally fermented dairy products from Xilin Gol in China,” *Food Science and Nutrition*, vol. 9, no. 3, pp. 1564-1573, 2021.
- [17] L. Guo *et al.*, “Simultaneous identification of bovine and equine DNA in milks and dairy products inferred from triplex TaqMan real-time PCR technique,” *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 8, pp. 6776–6786, Aug. 2018, <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14408>.
- [18] X. Hai *et al.*, “Triplex real-time PCR assay for the authentication of camel-derived dairy and meat products,” *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 11, pp. 9841–9850, Nov. 2020, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17245>.
- [19] K. Iijima, K. Suzuki, K. Ozaki, H. Kuriyama, Y. Kitagawa, and H. Yamashita, “DNA analysis for identification of food-associated foreign substances,” *Journal of Food Quality*, vol. 29, no. 5, pp. 531–542, Oct. 2006, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2006.00091.x>.
- [20] P. S. Girish *et al.*, “Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species,” *Meat Science*, vol. 66, no. 3, pp. 551–556, Mar. 2004, [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(03\)00158-x](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(03)00158-x).
- [21] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. Patel, “Basic principles of real-time quantitative PCR,” *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 5, no. 2, pp. 209–219, Mar. 2005, <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>.
- [22] I. López-Calleja *et al.*, “Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows’ milk in ewes’ milk mixtures,” *International Dairy Journal*, vol. 17, no. 7, pp. 729–736, Jul. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.005>.
- [23] Y. J. Ren *et al.*, “Identification of four animal derived components in milk and dairy products,” *Chinese journal of food hygiene*, vol. 34, no. 4, pp. 663-667, 2022.
- [24] C. Zhang, M. L. Fowler, N. Scott, G. Lawson, and A. Slater, “A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses,” vol. 18, no. 9, pp. 1149–1158, Sep. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.018>.



Сүү, цагаан идээн дэх үхрийн сүүний гарлыг тодорхойлох шинжилгээний аргын судалгаа

Мөчир¹, Гун-Аажав БАЯРМАА^{2*}

¹БНХАУ, Өвөрмонгол, Шилийн хот, Шилийн гол биоинженерийн дээд сургууль, Шилийн гол мэргэжлийн коллеж

²Монгол Улс, Улаанбаатар, Монгол Улсын их сургууль, Шинжлэх ухааны сургууль, Биологийн тэнхим

*Холбоо барих зохиогч: g.bayarmaa@num.edu.mn, <https://orcid.org/0000-0001-6550-657X>

Хураангуй. Малын гаралтай хүнс, тэжээлийн бүтээгдэхүүнийг хуурамчаар үйлдэх, залилан мэхлэх явдал гарч, малын гаралтай өвчин дамжих эрсдэл нэмэгдэж байгаатай холбогдуулан малын гаралтай бүтээгдэхүүнийг чанарын болон тоон илрүүлэх технологи нь хүнсний аюулгүй байдлыг хангах, хэрэглэгчийн эрх ашгийг хамгаалах судалгааны чухал сэдэв болж байна. Арван төрлийн амьтны митохондрийн геномын бүрэн дарааллыг харьцуулж, шинжлэн, үхрийн өвөрмөц праймерууд болон пробьг сонгон, бодит хугацааны полимеразын гинжин урвал (ПГУ) ашиглан үхрийн гаралтай сүүний орцыг тодорхойлох зорилготой энэ судалгааны ажлыг хийлээ. Үр дүнд нь үхрийн сүүний гаралтай орцыг илрүүлэхэд зориулж боловсруулсан хос праймер болон проб нь өвөрмөц бөгөөд мэдрэмтгий болохыг харуулсан. Энэ арга нь нэг пикограм ДНХ-ийг илрүүлэх чадвартай. Үхрийн сүүн, махан бүтээгдэхүүнд үхрийн гарал үүслийг тоон аргаар илрүүлсэн үр дүнгээс үзэхэд тус арга нь тоон илрүүлэх чадвар сайтай болохыг харуулж байна.

Түлхүүр үгс: үхрийн гаралтай найрлага, үхрийн өвөрмөц праймер, проб, TaqMan

Хүлээн авсан 2023.03.22; хянан тохиолдуулсан 2023.08.30; зөвшөөрсөн 2023.11.02

© 2023 Зохиогчид. [CC BY-NC 4.0 лиценз](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Оршил

Сүүн бүтээгдэхүүн нь үнээний сүү, хонины сүү зэргийг үндсэн түүхий эд болгон хэрэглэж, витамин, эрдэс бодис, бусад туслах материалыг зохих хэмжээгээр нэмж, хууль тогтоомж, зохих журмын дагуу боловсруулсан бүтээгдэхүүн юм [1]. Сүү, цагаан идээ нь хүнд зайлшгүй шаардлагатай хүнсний бүтээгдэхүүн юм. Тэжээллэг чанар сайтай, тааламжтай амттай, дархлаа сайжруулах чадвартай тул хэрэглэгчид дуртай байдаг [2]. Сүүлийн жилүүдэд хонины сүү [3], [4], ямааны сүү [5], [6], одос үхрийн сүү [7], [8], сарлагийн сүү [9], [10], гүүний саам [11], [12], илжигний сүү [13], [14], тэмээний сүү [15], [16] нь тэжээллэг чанар сайтай, өвөрмөц амт, олон төрлийн ашигтай элементүүд агуулдаг учраас хэрэглэгчдийн дунд түгээмэл болж байна.

Сарлаг, тэмээний сүү зэрэг нь боловсруулах үйлдвэр цөөн, сүүний гаралт хязгаарлагдмал боловч хэрэглэгчдийн эрэлт ихтэй учраас үнээний сүүнээс арав гаруй дахин илүү үнэтэй байдаг. Төрөл бүрийн малын гаралтай сүү, цагаан идээний үнийн зөрүү нь үйлдвэрлэгчид болон хууль бус худалдаа эрхлэгчдийг

хямд үнэтэй сүү цагаан идээг өндөр үнэтэй сүү, цагаан идээгээр орлуулахад хүргэж байгаа нь шударга худалдааны зах зээлийг алдагдуулаад зогсохгүй, эрх ашгийг зөрчиж байна. Мөн хэрэглэгчдийн эрүүл мэндэд аюул учруулж болзошгүй.

Сүү, цагаан идээний гарал үүсэл, орц найрлагыг буруу мэдээлэх байдлаар залилан мэхлэх явдал түгээмэл байгаа тул сүү, цагаан идээний гарал үүслийг үнэн зөв тодорхойлох арга технологийг бий болгох нь нэн чухал юм [17], [18]. Одоогийн байдлаар амьтны гаралтай бүтээгдэхүүний гарал үүслийг илрүүлэх аргууд нь дээж дэх тодорхой уураг, ДНХ-ийг илрүүлэх, шинжлэхэд үндэслэдэг фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (ФХЭБУ), полимеразын гинжин урвал (ПГУ), бодит хугацааны полимеразын гинжин урвал (БХ-ПГУ), электрофорез, хроматограф, масс спектрометр зэрэг юм. Бодит хугацааны полимеразын гинжин урвал нь илрүүлэх чадвар, үр ашиг, мэдрэг чанар өндөр, өвөрмөц шинж чанараар бусад аргуудаас давуу юм. Iijima нар [19] 18S рРНХ, Girish нар [20] митохондрийн 12S рРНХ генийн ДНХ-ийн дарааллыг тодорхойлж, хүнсний бүтээгдэхүүн

дэх амьтан, ургамлын гаралтай бүрэлдэхүүн хэсгүүдийг тодорхойлох аргыг боловсруулсан. Агуа нар [21] холимог махны дээж дэх гахайн махны орц найрлагыг чанарын болон тоон байдлаар илрүүлэх TaqMan бодит хугацааны ПГУ-д суурилсан технологийг боловсруулсан.

Энэхүү судалгаанд хонь, үхэр, сарлаг, одос үхэр, гахай, тахиа, нугас, адуу, туулай, галууны митохондрийн геномын бүрэн дарааллыг харьцуулан үхрийн гаралтай орц найрлагыг чанарын болон тоон байдлаар илрүүлэх өвөрмөц праймер, пробын хослолыг сонгож, эдгээр праймер, проб дээр үндэслэн сүү, цагаан идээ, махны дээж дэх үхрийн гарал үүслийг шалгах, илрүүлэхэд тохиромжтой аргыг боловсруулсан.

Судалгааны материал, арга зүй

Сүү, зөөхийн дээжийг Шилийн хот дахь фермерийн захаас худалдан авч туршилтад шууд ашигласан. Махны дээжийг Шилийн хот дахь фермерийн захаас болон малчнаас худалдаж авсан.

Сүү, цагаан идээний боловсруулалт

Шинжилгээнд хамрагдах сүүний дээж 100 мл, зөөхийн дээж 100 мг хэмжин авч, 4°C-т 4800 g, 10 мин хурдтай центрифугидсэн. Шингэнийг асгаж, тунадсыг PBS (30 мл)-аар уусгаж, 4°C, 4800 g хурдтай 10 мин центрифугидсэн. Дараа нь тунадас дээр PBS (30 мл) ба ОР эмульгатор (emulsifier) 10 мл нэмээд 4°C температурт 10 минутын турш угаасны дараа дээрхитэй адил центрифугдэж, дахин 2 удаа PBS (30 мл) -аар угааж (4°C, 4800 g, 10 мин), тунадсыг хадгална.

Геномын ДНХ ялгах

Сүү, зөөхийн дээжээс СТАВ (цетилтриметиламмонийн бромид) аргыг хэрэглэн геномын ДНХ ялгасан. Тунадсыг 1,5 мл тюбед хийгээд, 800 мкл ДНХ лизис буфер (1% СТАВ, 50 mM трис, 13.5 mM Na₂EDTA, 0.7 M NaCl, pH 8.0) нэмж холин, 65°C температурт 30 минут байлган, үе үе сэгсэрч хольсон. 13000 эрг/мин-д 5 минутын турш центрифугдэж, дээд давхаргыг цэвэр тюбе руу шилжүүлэн, ижил хэмжээний хлороформ/изоамилийн спирт (24:1) нэмээд сайтар хольж, 5

минутын турш 13000 эрг/мин-д центрифуг хийж, дээд давхаргыг авч, ижил эзлэхүүнтэй изопропанол нэмж, сайтар хольж, 13000 эрг/мин-д 5 минутын турш центрифуг хийж, дээд давхаргыг хаяж, 75% этилийн спиртээр нэг удаа угааж, агаарт хатааж, ddH₂O-д уусгаж, -20°C хэмд хадгалсан. ДНХ-ийн концентрац ба цэвэршилтийг 2000c NanoDrop спектрофотометр (Thermo Fisher, USA) ба агароз гель электрофорезоор шалгаж, ДНХ-ийг цаашдын шинжилгээнд зориулж 100 нг/ мкл байхаар шингэлэв. MagAttract HMW DNA kit (QIAGEN) болон TaKaRa MiniBest Universal Genomic DNA isolation kit-ийг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу геномын ДНХ ялгахад ашиглав. TaKaRa MiniBest Universal Genomic DNA isolation kit-ийг ашиглан махны эдийн дээжээс геномын ДНХ ялгасан. Гель электрофорезийг Trans 15K ДНХ маркер (Beijing Quanshi Gold Biotechnology Co, LTD), дээж тус бүрээс ойролцоогоор 600 нг ДНХ-ийг 0.8%-ийн агароз гельд гүйлгэн, 10 минут этидиум бромидоор будаж, зургийг (imaging analyzer, Thermo Fisher, USA) авсан.

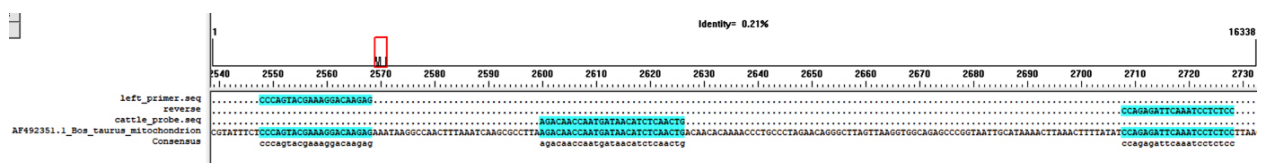
Праймер, проб

Судалгаанд үхрийн (*Bos taurus*) митохондрийн рРНХ генийн дараалалд зохиосон праймер, проб ашиглав. GenBank-ийн өгөгдлийн санд хадгалагдаж буй митохондрийн ДНХ-ийн дараалалд харьцуулалт хийж, Primer Premier программ ашиглан рРНХ генийн дараалалд праймер болон проб ашиглан сонгож, Ruibiotech компанид (Бээжин, Хятад) нийлэгжүүлсэн. NCBI (Биотехнологийн мэдээллийн үндэсний төв)-ийн BLAST (Local Alignment Search Basic Tool) программ ашиглан праймер, пробын өвөрмөц байдлыг шалгасан. Үхрийн өвөрмөц пробыг 5' төгсгөлд HEX, 3' төгсгөлд BHQ флюоресцент будгаар тэмдэглэсэн. Үхрийн митохондрийн рРНХ генийн (LC745718.1 ба

1-р хүснэгт. Үхрийн өвөрмөц праймер ба пробын дараалал

	Дараалал 5' → 3'
Шууд праймер	CCCAGTACGAAAGGACAAGAG
Урвуу праймер	GGAGAGGATTGGAATCTCTGG
Проб	^a HEX-AGACAACCAATGATAACATCT-CAACTG- ^b BHQ ₂

Тайлбар: ^aHEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein, ^bBHQ₂, black hole quench group



1-р зураг. *Bos taurus* митохондрийн геном дэх үхрийн өвөрмөц праймер ба пробын байрлал.

LC745515.1) праймер ба пробын хэсгийг 1-р зураг, дарааллыг 1-р хүснэгтэд үзүүлэв.

Бодит хугацааны ПГУ

Бодит хугацааны ПГУ-ыг нийт 20 мкл эзэлхүүнээр хийсэн: TransStart qPCR SU-Premix 2 мкл, үхрийн шууд праймер (10 мкМ) 1.0 мкл, үхрийн урвуу праймер (10 мкМ) 1.0 мкл, проб (10 мкМ) 1.0 мкл, ДНХ (100 нг/мкл) 1.0 мкл. ПГУ-ын нөхцөл нь: 94°C-т 30 сек денатураци хийсний дараа 94°C-т 5 сек, 60°C-д 31 сек, 40 цикл

Илрүүлэх хязгаар ба тоон шинжилгээ

Гурван өөр аргаар ялгаж авсан сүү, зөөхийн ДНХ-ийг ddH₂O-ээр градиентээр шингэлсэн. Шингэрүүлэлт тус бүрт 10 дахин, нийт 5 удаа шингэлэв (10 нг/мкл, 1 нг/мкл, 0.1 нг/мкл, 0.01 нг/мкл, 0.001 нг/мкл). Өөр өөр шингэрүүлэлтийн зэрэг бүхий зургаан дээжийн ДНХ-ийг бодит хугацааны флюоресцент ПГУ-аар олшруулахад ашигласан. Стандарт муруйг St аргаар тодорхойлсон.

Мэдээлэл боловсруулах

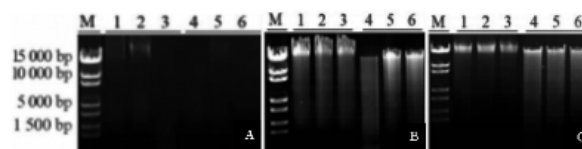
Олшруулалтын муруй болон St утгыг 7300Plus бодит хугацааны ПГУ-ын (ABI, USA) олшруулалтын программыг ашиглан шинжлэв. Туршилт бүрт гурван зэрэгцээ туршилт явуулсан бөгөөд үр дүнг дундаж ± стандарт хазайлтаар илэрхийлэв.

Үр дүн

Дээжийн ДНХ-ийн концентрац ба цэвэршилт

СТАВ арга, ТаKaRa болон MagAttract кит хэрэглэж сүү, зөөхийн дээжээс ойролцоогоор 100 нг/мкл концентрац бүхий ДНХ ялгаж авсан (**2-р хүснэгт**). Сүүний дээжээс СТАВ арга болон ТаKaRa китээр ялгаж авсан ДНХ-ийн A_{260/A280} утга нь 1.8-тай ойролцоо байсан нь ДНХ-ийн цэвэршилт өндөр байгааг харуулж байна. MagAttract китээр

ялгаж авсан сүүний ДНХ-ийн A_{260/A280} харьцаа 1.6 орчим байна. Эдгээр гурван арга нь сүү, зөөхийн дээжээс концентрац өндөр, цэвэршилт сайтай ДНХ ялгах боломжтойг харуулж байна. ТаKaRa болон MagAttract кит ашиглан ялган авсан ДНХ нь уураг зэрэг хольцоор бохирдсон байгаа нь силика мембран, соронзон бөмбөлгүүд нь уураг, өөх тосыг шингээж байгаа болохыг харуулж байна. Ижил аргаар өөр өөр дээжээс (сүү, зөөхий) ялгасан ДНХ нь ялгаатай цэвэршилттэй байсан нь зөөхий нь сүүнээс илүү уураг, өөх тос агуулдаг бөгөөд энэ нь силика мембран, соронзон бөмбөлөг нь уураг, өөх тосыг илүү шингээж, A_{260/A280} утгыг багасгасан байх магадлалтай. Агарозын гель электрофорезоор гурван өөр аргаар ялгаж авсан ДНХ-ийн задралыг шалгасан. 2A-р зурагт үзүүлснээр СТАВ аргаар гаргаж авсан сүү, зөөхийн ДНХ задарч, тодорхой ДНХ-ийн зурвас харагдахгүй байв. ТаKaRa кит ашиглан сүү, зөөхийн дээжээс ялган авсан ДНХ хагас задарсан (2B-р зураг) байгаа бол сүүний дээжээс MagAttract китээр ялгаж авсан ДНХ (2C-р зураг) бүрэн бүтэн байдал сайтай (задраагүй), харин зөөхийн ДНХ бага зэрэг задарсан байна. Дээрх үр дүнгээс үзэхэд нэг адил дээжид ДНХ ялгах гурван аргын дотроос MagAttract кит ашигласан арга нь илүү сайн үр дүнтэй байна.



2-р зураг. Сүү, зөөхийний дээжээс ДНХ-ийг СТАВ аргаар (A), ТаKaRa кит (B), MagAttract кит (C) ашиглан ялгаж авсан ДНХ-ийн электрофореграмм. М:Транс 15К ДНХ маркер; 1-3: сүүний дээж 1-3, 4-6: зөөхийний дээж 1-3.

Үхрийн гаралтай орц найрлагыг бодит хугацааны ПГУ-аар илрүүлэх

Үхрийн өвөрмөц праймер болон проб ашиглан

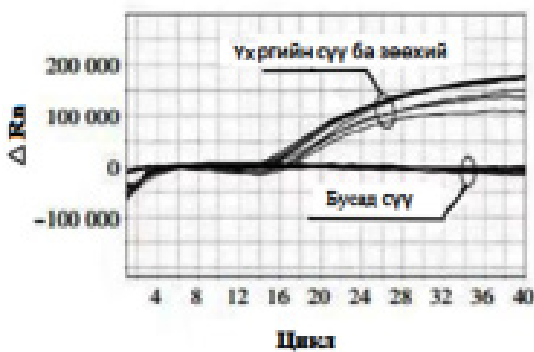
2-р хүснэгт. Сүү, зөөхийн ДНХ-ийн концентрац ба цэвэршилт

Дээж	СТАВ		TakaRa kit		MagAttract kit	
	ДНХ концентрац (нг/мкл)	A _{260/280}	ДНХ концентрац (нг/мкл)	A _{260/280}	ДНХ концентрац (нг/мкл)	A _{260/280}
Сүү 1	112.6	1.83	78.4	1.83	106.7	1.64
Сүү 2	118.5	1.84	127.9	1.84	99.6	1.63
Сүү 3	116.4	1.82	125.1	1.83	105.2	1.66
Зөөхий 1	122.3	2.03	115.6	1.24	118.7	1.54
Зөөхий 2	117.4	1.95	89.5	1.27	123.6	1.50
Зөөхий 3	120.4	1.98	120.4	1.25	120.4	1.56

зургаан үхрийн дээжээс авсан сүү, зөөхий, махны геномын ДНХ-ийг шингэрүүлэгчийг загвар болгон ашиглан бодит хугацааны флюоресцент тоон ПГУ-аар (TaqMan пробын арга) илрүүлсэн. Үхрийн сүү, цөцгий (3А-р зураг), махны (3В-р зураг) дээжид олшруулалтын муруй ажиглагдаж, бусад дөрвөн өөр малын сүү, долоон өөр амьтны булчингийн эдэд олшруулалтын муруй ажиглагдаагүй (**3-р зураг**). Бодит хугацааны ПГУ-аар илрүүлсэн үнээний сүү, зөөхий, махны дээжийн St утгыг 3-р хүснэгт үзүүлэв. Сүү, зөөхийн дээжийн St утгууд (зургаан дээж, тус бүрийг гурван удаагийн давталттай туршсан) бүгд 0-ээс их ба 35-аас бага байсан нь дээжийн гарал үүсэл нь амьтны гарал үүсэлтэй нийцэж байгааг харуулж байна. Амьтны гарал үүслийн шинжилгээний үндэсний стандартын дагуу (SN/ T2051-2008 “Хүнс, гоо сайхан, тэжээлийн бүтээгдэхүүн дэх үхэр, хонь, гахайн гаралтай орц, найрлагыг илрүүлэх; БНХАУ-ын экспорт, импортын хяналт, хорио цээрийн стандарт”) болон өмнөх судалгааны үр дүнгийн [6] дагуу олшруулалтын муруй байгаа үед дээжийн St утга 0-тэй тэнцүү биш, 35-аас бага байвал дээжийг харгалзах эх үүсвэр гэж тодорхойлно. Дөрвөн малын (хонь, гүү, одос үхэр, тэмээ) сүүний ДНХ болон долоон амьтны (гахай, хонь, адуу, тахиа, нугас, туулай, галуу) булчингийн геномын ДНХ-ийн St утга 0 байгаа нь эдгээр дээжийг үхрийн гаралтай биш болохыг харуулж байна. Энэхүү судалгааны үр дүн нь бидний боловсруулсан праймер болон пробыг ашиглан сүү, цөцгий дэх үхрийн гаралтай орц найрлагыг илрүүлэхэд үр дүнтэй болохыг харуулж байна.

Бодит хугацааны ПГУ-ын мэдрэг чанар

Үхрийн сүүний геномын ДНХ-ийг градиентээр 10¹-10⁷ дахин шингэлж, үхрийн гаралтай орц найрлагын мэдрэг чанарыг илрүүлэх туршилт

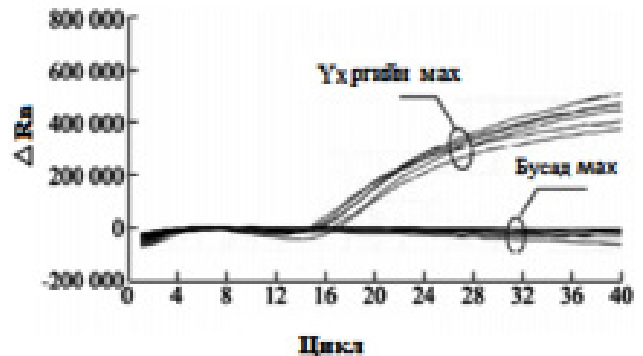


3-р хүснэгт. Сүү, зөөхий, махны эдийн дээжийн ДНХ ба St-ийн хандалтын үнэлгээ

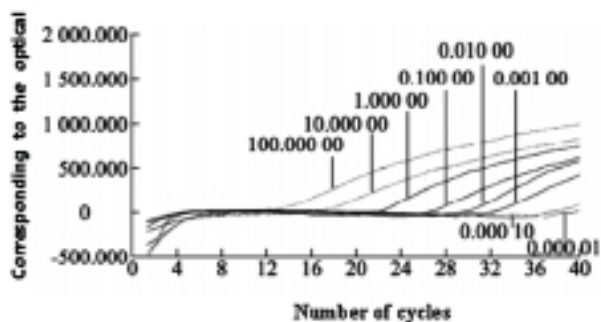
Дээж	ДНХ концентрац (нг/мкл)	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	St утга
Сүү 1	103.7	1.64	16.19 ± 0.84
Сүү 2	99.6	1.62	21.52 ± 0.58
Сүү 3	105.1	1.66	25.38 ± 0.35
Зөөхий 1	118.7	1.54	29.95 ± 0.42
Зөөхий 2	123.6	1.50	33.13 ± 0.29
Зөөхий 3	120.4	1.55	35.59 ± 0.40
Үхрийн мах 1	103.2	1.87	13.23 ± 0.04
Үхрийн мах 2	108.2	1.89	14.33 ± 0.14
Үхрийн мах 3	108.2	1.87	14.33 ± 0.04
Үхрийн мах 4	106.5	1.86	13.33 ± 0.03
Үхрийн мах 5	103.2	1.87	13.23 ± 0.04
Хонины сүү	119.4	1.87	-
Гүүний сүү	110.1	1.92	-
Одос үхрийн сүү	111.9	1.78	-
Ингэний сүү	119.7	1.88	-
Гахайн мах	129.1	1.89	-
Хонины мах	116.4	1.87	-
Адууны мах	121.1	1.89	-
Тахианы мах	105.9	1.88	-
Нугасны мах	122.7	1.90	-
Туулайн мах	109.4	1.86	-
Галуун мах	102.8	1.84	-

Жич: “-” илрээгүй.

хийхэд үхрийн геномын ДНХ (100.000 00 нг), 10¹ (10.000 00 нг), 10² (1.000 00 нг), 10³ (0.100 00 нг), 10⁴ (0.0100 00 нг), 10⁵ дахин (0.001 00 нг) шингэрүүлсэн үед олшруулалтын муруй үүссэн ба шингэрүүлэлт ихсэх тусам баруун тийш шилжиж байсан (Зураг 4). 10⁶ (0.000 10 нг) ба 10⁷ (0.000 01 нг) дахин шингэрүүлэлтийн үед олшруулалтын муруй



3-р зураг. Үхрийн сүү, зөөхийн дээж дэх үхрийн гаралтай орц найрлагыг тодорхойлох; (А) сүү болон зөөхийн дээж, (В) махны эдийн дээж



4-р зураг. Үхрийн гаралтай орц найрлагыг илрүүлэх хязгаар

4-р хүснэгт. Үхрийн сүү, зөөхийн ДНХ-ийн илрүүлэх хязгаарын үр дүн

Концентрац	Ct утга	
	MagAttract кит	
	Сүү	Зөөхий
100	16.73 ± 0.40	16.15 ± 0.85
10	21.30 ± 0.13	21.24 ± 0.39
1	23.81 ± 0.17	25.38 ± 0.24
0.1	27.73 ± 0.29	29.95 ± 0.32
0.01	30.21 ± 0.13	33.23 ± 0.19
0.001	34.45 ± 0.30	35.47 ± 0.40
0.0001	-	-
0.00001	-	-

Жич: “-” илрээгүй.

5-р хүснэгт. Сүү, зөөхий стандарт муруйн налуу, үр ашиг ба корреляцийн коэффициент (r^2)

Test item	Ct утга	
	Сүү	Зөөхий
Зөөхийн стандарт муруй (r^2)	0.9949	0.9993
Налуугийн коэффициент	-3.363	-3.55
ПГУ-ын үр ашиг (%)	98.31	91.16

6-р хүснэгт. Махан бүтээгдэхүүн дэх үхрийн тоон үзүүлэлт

Дээж	Ct утга	Илэрсэн массын концентрац (нг/мкл)
Үхрийн борц	15.47	262.03
	15.31	307.03
	15.92	207.93
	15.74	217.78
	15.39	276.42

ажиглагдаагүй. Бодит хугацааны ПГУ-аар дээжийн гарал үүслийг илрүүлэх шингэрүүлсэн дээжийн Ct утгыг Хүснэгт 4-т үзүүлэв. ДНХ-ийн концентрац 100.000 00 нг-аас 10^5 дахин шингэлсэн (0.001 00

нг) утгын хооронд Ct утга тэгтэй тэнцүү биш, 35-аас бага байж, Ct утга ДНХ-ийн концентрацын шингэрүүлэлтийг даган аажмаар нэмэгдэж байна. Үхрийн сүү, зөөхийн геномын ДНХ-ийг 10^6 ба 10^7 дахин шингэлж үзэхэд Ct-ийн утга 0 байсан. Дээрх үр дүнгээс үзэхэд үхрийн өвөрмөц праймер, проб дээр үндэслэсэн үхрийн ДНХ-ийг илрүүлэх арга нь 0.001 нг үхрийн ДНХ-ийг амжилттай илрүүлж, зорилтот ДНХ-ийг танихад мэдрэг чанар өндөртэй байна.

Үхрийн гаралтай орц найрлагын тоон илрүүлэлт

Сүү, зөөхийн геномын ДНХ-ийн стандарт муруйг ашиглан сүүн бүтээгдэхүүн дэх үхрийн сүүний орцын хэмжээг тодорхойлж болно. Үхрийн ДНХ-ийн концентрацын зургаан цуврал шингэрүүлэлтийн графикийг үхрийн гаралтай орц найрлагын хэмжээг тодорхойлох муруйг зурахад ашигласан (хүснэгт 5). Харгалзах Ct утга болон үхрийн зөөхийн стандарт муруйн дагуу сүү, зөөхий дэх үхрийн гаралтай бүрэлдэхүүн хэсгүүдийн тоон утгыг тооцоолж болно. Боловсруулсан махан бүтээгдэхүүн (үхрийн борц) дэх үхрийн махны орцыг бодит хугацааны ПГУ-аар тоон утгыг хэмжихэд үхрийн махны стандарт муруйгаас тооцоолсон харгалзах массын концентрац нь бодит массын концентрацын утгатай сайн тохирч байв (6-р хүснэгт). Дээрх үр дүнгээс үзэхэд бидний сонгосон праймер, проб нь сүү, цагаан идээ дэх үхрийн гаралтай орц найрлагыг тодорхойлох, тоон утгаар илрүүлэх чадвартай болохыг харуулж байна.

Хэлэлцүүлэг

Хүнсний бүтээгдэхүүн дэх амьтны орц найрлагыг илрүүлэхэд бодит цагийн ПГУ-ын технологийг ашиглах нь хяналтын байгууллагуудад чухал шаардлагатай. Энэхүү технологи нь хүнсний аюулгүй байдлын менежментийг сайжруулах, сүүний зах зээл дэх хуурамч сүүн бүтээгдэхүүний асуудлыг шийдвэрлэх шинжлэх ухаанд үндэслэсэн, үр дүнтэй арга юм.

Одоогийн байдлаар амьтны гаралтай орц найрлагыг илрүүлэх нь ихэвчлэн стандарт ПГУ болон ДНХ-тэй холбогддог флуоресцент будаг ашиглах бодит хугацааны ПГУ дээр суурилдаг. Сүүлийн жилүүдэд гаралтай орц найрлагыг тодорхойлоход TaqMan проб дээр суурилсан технологийг ашиглах нь нэмэгдэж байна. TaqMan проб ашиглах бодит хугацааны ПГУ нь цэвэршилт сайтай ДНХ-ийн дээж, тухайн дээжид өвөрмөц праймер, пробьг хэрэглэдэг. Бодит хугацааны ПГУ-ын хоёр аргыг харьцуулахад TaqMan проб арга нь илрүүлэх чадвар илүү өндөр

байдаг.

Энэ судалгаагаар сүү, сүүн бүтээгдэхүүн дэх үхрийн сүүний орц найрлагыг хурдан, үнэн зөв, тогтвортой илрүүлдэг өвөрмөц байдал болон мэдрэг чанар өндөртэй бодит цагийн флуоресценцийн тоон ПГУ-ын аргыг бий болгосон. Lopez-Calleja [22] нарын судалгаагаар харьцуулахад ямааны сүүнд агуулагдах сүүний орцыг илрүүлэх хязгаар нь 0.5%-иар өндөр байна. Yijie [23] нарын холимог сүүнд үхрийн гарал үүслийг тодорхойлох праймер, пробын илрүүлэлтийн хязгаараас 1%-иар их байсан. Мах, махан бүтээгдэхүүн дэх үхрийн гарал үүслийг илрүүлэх хязгаар нь Zhang [24] нарын ашигласан праймер, пробтой харьцуулахад 0.035 нг-аар их байна. Мөн энэхүү судалгаанд боловсруулсан праймер, проб нь худалдаанд байгаа үхрийн махан хиамны орц найрлагыг үр дүнтэй тодорхойлж, уг аргын өвөрмөц чанар, өндөр мэдрэмжтэй, өргөн хэрэглээний боломжтойг харуулсан.

Дүгнэлт

Митохондрийн геномын рРНХ генийн нуклеотидын дарааллыг харьцуулан сонгосон үхрийн өвөрмөц проб нь бодит хугацааны ПГУ явуулахад үр дүнтэй байсан.

Судалгааны дээжид ашигласан шууд, урвуу праймер болон пробын зохистой харьцаа нь 1 нг:1 нг байв. Мэдрэг чанарын шинжилгээний үр дүнд үндэслэн уг арга нь 1 пикограмм үхрийн ДНХ-ийг илрүүлэх чадвартай болохыг тогтоосон.

Үхрийн өвөрмөц проб ашиглан үхрийн гаралтай орц найрлагыг илрүүлэх хурдан, үнэн зөв, тогтвортой бодит цагийн ПГУ-ын аргыг боловсруулсан.

Ашигласан бүтээл

[1] L. C. Liao, “Development of dairy products and HACCP System Certification of dairy products,” *Food Safety Guide*, vol. 21, pp. 61-62, 2017.

[2] J. L. Liu, “Development of polymerase chain reaction-based techniques to detect adulteration of goat milk with bovine milk,” Xi’an: Shaanxi University of Science and Technology, 2018.

[3] W. Y. Quan, H. L. Xia, S. Gang, “Nutritional and Therapeutic Properties of Goat Milk,” *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, vol. 29, no. 1, pp. 66-67, 2010.

[4] Y. B. Wang, S. Xu, Y. M. Hou, “Research progress on the Nutritional Composition of Goat Milk,” *Chinese Journal of Food and Nutrition*, vol. 18 no. 10, pp 67-71, 2012.

[5] T. Chen *et al.*, “Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk,” *BMC Microbiology*, vol. 20, no. 1, Jul. 2020, <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01920-6>.

[6] A. Nudda *et al.*, “Effects of nutrition on main components of sheep milk,” *Small Ruminant Research*, vol. 184, p. 106015, Mar. 2020, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.11.001>.

[7] J. H. Dai *et al.*, “Research progress on nutrition and function of buffalo milk,” *Chinese Dairy Cows*, vol. 6, pp. 10-13, 2017.

[8] Q. Y. Li *et al.*, “Research progress on components and functional properties of buffalo milk,” *Food Science*, vol. 32, no. 3, pp. 305-309, 2011.

[9] F. Yang, Z. Luo, X. Shen, C. Liu, W.-Y. Huang, and S. Shuguo, “Study on Nutrition, Flavor Characteristics and Antioxidant Activity of Yak Milk Dregs at Different Elevations in Tibet,” *Science and Technology of Food Industry*, vol. 42, no. 11, pp. 81–88, Jun. 2021, <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090265>.

[10] J. Zhang, M. Yang, D. Cai, Y. Hao, Z. Yang, “Composition coagulation characteristics and cheese making capacity of yak milk,” *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 2, pp. 1276-1288, 2020.

[11] G. Liang *et al.*, “Study of bacterial and fungal community structures in traditional koumiss from Inner Mongolia,” *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 3, pp. 1972-1984, 2019.

[12] L. Guo *et al.*, “Production technology, nutritional, and microbiological investigation of traditionally fermented mare milk (Chigee) from Xilin Gol in China,” *Food Science and Nutrition*, vol. 8, no. 1, pp. 257–264, Dec. 2019, <https://doi.org/10.1002/fsn3.1298>.

[13] Z. Wenwen *et al.*, “Chemical nutrients and bioactivity of donkey milk,” *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, vol. 8, no. 12, pp. 4574-4581, 2017.

[14] Y. Y. Liu *et al.*, “Determination of physical and chemical properties and microorganisms in fresh donkey milk,” *Xinjiang Animal Husbandry*, vol. 32, no. 11, pp. 50-51, 2017.

[15] F. Benmeziane – Derradji, “Evaluation of camel milk: gross composition—a scientific overview,” *Tropical Animal Health and Production*, vol. 53, no. 2, p. 308, May 2021, <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02689-0>.

[16] G. Liang *et al.*, “Comparative study of physicochemical composition and microbial

- community of khoormog, chigee, and airag, traditionally fermented dairy products from Xilin Gol in China,” *Food Science and Nutrition*, vol. 9, no. 3, pp. 1564-1573, 2021.
- [17] L. Guo *et al.*, “Simultaneous identification of bovine and equine DNA in milks and dairy products inferred from triplex TaqMan real-time PCR technique,” *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 8, pp. 6776–6786, Aug. 2018, <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14408>.
- [18] X. Hai *et al.*, “Triplex real-time PCR assay for the authentication of camel-derived dairy and meat products,” *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 11, pp. 9841–9850, Nov. 2020, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17245>.
- [19] K. Iijima, K. Suzuki, K. Ozaki, H. Kuriyama, Y. Kitagawa, and H. Yamashita, “DNA analysis for identification of food-associated foreign substances,” *Journal of Food Quality*, vol. 29, no. 5, pp. 531–542, Oct. 2006, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2006.00091.x>.
- [20] P. S. Girish *et al.*, “Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species,” *Meat Science*, vol. 66, no. 3, pp. 551–556, Mar. 2004, [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(03\)00158-x](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(03)00158-x).
- [21] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. Patel, “Basic principles of real-time quantitative PCR,” *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 5, no. 2, pp. 209–219, Mar. 2005, <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>.
- [22] I. López-Calleja *et al.*, “Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows’ milk in ewes’ milk mixtures,” *International Dairy Journal*, vol. 17, no. 7, pp. 729–736, Jul. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.005>.
- [23] Y. J. Ren *et al.*, “Identification of four animal derived components in milk and dairy products,” *Chinese journal of food hygiene*, vol. 34, no. 4, pp. 663-667, 2022.
- [24] C. Zhang, M. L. Fowler, N. Scott, G. Lawson, and A. Slater, “A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses,” vol. 18, no. 9, pp. 1149–1158, Sep. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.018>.