ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН

На правах рукописи

АХРЕМКО АНАСТАСИЯ ГЕННАДЬЕВНА

«Совершенствование протеомного метода для качественного определения белкового состава мяса и мясных продуктов»

Специальность:
05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель: кандидат технических наук, Федулова Лилия Вячеславовна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3
ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 8
1.1. Состояние вопроса и аспекты протеомных исследований пищевых продуктов 8
1.2. Современные протеомные подходы и методы к изучению пищевых продуктов 11
1.3 Современные знания о протеомных исследованиях мяса и мясных продуктов 20
1.4. Заключение по обзору научно-технической литературы 27
ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 29
2.1. Объекты исследования 29
2.2. Организация эксперимента 30
2.3. Методы исследований 32
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 36
3.1. Результаты подбора оптимальных условий для проведения двумерного электрофореза при изучении мясного сырья 36
3.2. Результаты изучения протеомного профиля образцов мышечной ткани разной локализации свиней в разные периоды онтогенеза 42
3.3. Результаты протеомных исследований фаршевых систем 49
3.3.1. Исследование белкового состава модельных фаршей с заданным количеством сырья электрофоретическим методом 49
3.3.2. Изучение воздействия различных температур (замораживание и тепловая обработка) в мясных системах путем сравнительного анализа двумерных карт 54
3.4. Результаты протеомных исследований готовых мясных продуктов – кусковых мясных консервов 57
3.5. Экономическая эффективность 60
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 62
Список сокращений и условных обозначений 64
Список использованной литературы 65
Приложения 83

Введение

Актуальность темы. Мясо и мясные продукты всегда будут играть важную роль в рационе человека как источник полноценного белка. Существует большое разнообразие продуктов переработки мяса, ассортимент которых регулярно пополняется. В зависимости от технологии переработки белки мяса подвергаются различным модификациям, которые оказывают влияние на качество мяса, срок годности и пищевую ценность [Gómez et al., 2020]. На все это также могут оказывать влияние следующие факторы: генетика, окружающая среда, условия содержания животных и дальнейшая переработка. Поэтому вызывает интерес молекулярные механизмы, лежащие в основе модификации белков. Важно отметить, что генетическая информация остается статической в течение жизни животного, в то время как белковый состав динамичен и меняется в зависимости от факторов, влияющих на синтез или деградацию белка [Baehr et al, 2017]. Исследование протеома дает возможность не только изучить молекулярные механизмы на более глубоком уровне, происходящие в тканях, но и спрогнозировать интересующие свойства мясного сырья и продуктов [Purslow et al, 2021].

Сегодня стремительно развивающиеся методы протеомики применяют для разделения белков, в основном, в двух направлениях: хроматографические или электрофоретические методы с последующей идентификацией белков при помощи масс-спектрометрических детекторов [Suman et al., 2014; Л.В. Федулова, 2018]. В связи с этим особо актуальным является подбор условий протеомного анализа для расширения возможностей и более детального изучения мышечной ткани продуктивных животных, в том числе в составе мясных продуктов.

Степень разработанности темы. Научными и прикладными исследованиями в области протеомики сельскохозяйственных животных, включая изучение автолитических процессов, протеолиза, окислительных реакций, стабильность цвета, вкуса и запаха мяса, занимались такие ученые, как Л.И. Ковалев, С.С. Шишкин, И.М. Чернуха, E. Bendixen, A.M. de Almeida, D. Eckersall, L. Mora, F. Toldrá, I. Miller, M.A. Sentandreu, S.P. Suman, M. Montowska, E. Pospiech и др.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках:

– гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-316-90056 «Выявление и изучение основных вариаций аберрантных протеоформ мышечной ткани свиней» (2019 – 2021 г.).

– гранта Российского научного фонда № 19-76-10034 «Направленная *in vivo* модификация протеостаза продуктивных животных для создания инновационной технологии дието-терапевтического мясного продукта» (2019 – 2021 г.).

Целью настоящей работы является разработка оптимальных условий пробоподготовки и проведения электрофоретического анализа для качественного определения белкового состава мяса и мясных продуктов, а также для выявления основных групп, модифицируемых мышечных белков.

В рамках поставленной цели решались следующие основные **задачи**:

1. На основе анализа литературных данных изучить варианты проведения двумерного электрофореза и подобрать оптимальные условия для повышения разрешающей способности метода анализа белков мышечной ткани.

2. Провести протеомные исследования мышечной ткани свиней различной локализации в разные периоды онтогенеза; посредством биоинформационного анализа изучить полученные протеомные карты и выявить белки, участвующие в процессах роста и развития свиней и формирующие качественные показатели мясного сырья и продуктов.

3. Определить основные группы модифицируемых мышечных белков модельных фаршевых систем после различного температурного воздействия.

4. Апробировать условия протеомного исследования белковой составляющей мясных продуктов на примере кусковых мясных консервов из свинины и говядины, получить протеомные карты составных частей консервов.

5. Разработать и утвердить методические рекомендации по выявлению белков и интерпретации результатов одно- и двумерных электрофореграмм и стандарт организации на методику подготовки проб для проведения 2D – электрофореза для кусковых консервов.

Научная новизна исследования.

- Подобраны оптимальные условия проведения изоэлектрофокусирования для выявления белков мышечной ткани.
- Получены протеомные карты мышц различной локализации поросят и половозрелых свиней. Выявлены вариации основных групп мышечных белков, участвующих в процессах роста и развития свиней и формирующие качественные показатели мясного сырья и продуктов.
- Выявлены и описаны группы мышечных белков модельных фаршевых систем, модифицируемых после различных температурных воздействий.

Теоретическая и практическая значимость.

- Усовершенствован метод протеомного анализа, который может быть использован как полуколичественный скрининговый метод определения белкового состава мяса и мясных продуктов.
- Обосновано применение анодного варианта изоэлектрофокусирования, когда изменено направления тока, и дополнительная инкубация в буфере с йодацетамидом для получения более четкого разделения белковых фракций.
- Адаптирован процесс пробоподготовки для повышения разрешающей способности электрофоретического анализа кусковых мясных консервов и разработан СТО 00419779-000-2021 Консервы кусковые мясные и мясосодержащие. Методика подготовки проб для проведения 2D – электрофореза.
- На основе проведенных исследований разработаны и утверждены методические рекомендации по анализу результатов одно- и двумерных электрофореграмм, которые используются в подразделениях ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, а также при подготовке дипломных работ бакалавров и магистров ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», ФГБОУ ВО «МГАВМиБ им. К.И. Скрябина», «РГАУ – МСХА м. К.А. Тимирязева», ФГБОУ ВО «МГУПП».

Методология и методы исследований.

Использованы протеомные методы исследования, включающие электрофоретическое разделение, компьютерную денситометрию, масс-спектрометрическую идентификацию, а также методы биоинформационного анализа.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Обоснованы параметры разделения белковых фракций методом двумерного электрофореза.
- Выявлены различия протеомов мышечной ткани разной локализации поросят и половозрелых свиней на основании сравнительного анализа белков: показано, что в процессе роста и развития свиней в их мышечной ткани снижается концентрация белков, но при этом происходит увеличение их количества; изменениям подвержены, преимущественно, белки актомиозинового комплекса.
- При оценке качественного состава фаршевых систем из свинины и говядины обоснован выбор бета-енолазы и изоформ миозиновых легких цепей как кандидатных биомаркеров видовой принадлежности; порог чувствительности метода – 0,1% сырья, вносимого в фаршевую систему.
- После термического воздействия (замораживание и варка) выявлена деградация миозиновых легких цепей 2 и триозофосфатизомеразы 1.
- Показана наибольшая информативность результатов при раздельном (мясо и бульон) изучении протеомных карт мясных кусковых консервов.

Степень достоверности и апробации работы.

Результаты выполненной работы и их достоверность подтверждается корректным использованием теоретических и экспериментальных методов обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. Использование современных средств и методик проведения исследований обеспечивает достоверность экспериментальных данных. Теоретические положения основаны на известных достижениях как фундаментальных, так и прикладных научных дисциплин, связанных с предметом исследования.

Результаты исследования доложены на: XIV Scientific conference with international participation “Food safety and control” (Пьештьяны, 2017); Международной конференции молодых ученых «Молодежь в науке 2017» (Минск, 2018); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018); 48th Lenfeld's and Hökl's Days 2018 “Food Hygiene and Technology” (Брно, 2018); XIII Annual Congress of the European Proteomics Association: From genes via proteine and their interaction to function (Потсдам, 2019); IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2019); XIV Международном биотехнологическом форуме «РосБиоТех-2020» (Москва, 2020); XII Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств» (Могилёв, 2021).

ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Состояние вопроса и аспекты протеомных исследований пищевых продуктов

Протеомику можно определить, как крупномасштабный анализ белков в конкретной биологической системе в определенный момент времени в определенных условиях [Pandey and Mann, 2000]. Анализ включает структурную и функциональную идентификацию белков, их количественное определение, выявление посттрансляционных модификаций (ПТМ), белок-белковые взаимодействия и исследования локальных белков. В частности, протеомика пищевых продуктов – это систематическая и полная картография белков продуктов питания с особым упором на биоактивные и функциональные свойства. Белки являются надежными индикаторами многих свойств, связанных с качеством, составом и происхождением пищевых продуктов [Ортеа и др., 2016]. Систематическая идентификация маркерных белков или пептидов, указывающая на индуцированные процессингом изменения, потенциальную фальсификацию или микробное загрязнение – мощный инструмент для контроля нормативных требований и, соответственно, качества продукции.

Определение и модели качества пищевых продуктов

Понятие качества еды является сложным, потому что оно зависит от человека, места и времени. Согласно американскому словарю [Merriam-Webster.com], даже термин «качество» может быть определен по-разному в зависимости от контекста, либо как «неотъемлемая черта», «степень совершенства», «отличительный признак» или «атрибут элементарного ощущения, принципиально отличающий его от любого другого ощущения». В википедии термин «качество» определен как «совокупность минимально допустимых требований к продукции, обусловливающих её пригодность удовлетворять определённые потребности в соответствии с её назначением». Однако все эти определения не содержат абсолютного понимания. Поэтому качество продуктов питания может считаться и как наиболее четко определенным, так и наименее четко определенным понятием в зависимости от того, кого вы спрашиваете и что вы

измеряете [Cardello, 1995]. Принимая во внимание эти соображения, неудивительно, что определение качества пищевых продуктов со временем изменилось с «комбинации атрибутов или характеристик продукта, которые имеют значение для определения степени приемлемости продукта для пользователя» [Nikhontha et al., 2019] к концепциям, которые переносят акцент с самой пищи на восприятие или приемлемость пищи для потребителя [Onyenweaku et al., 2020]. Более современные целостные концепции качества пищевых продуктов учитывают динамические взаимосвязи между условиями обработки, характеристиками продукта и требованиями потребителей. Эту совокупность качества пищевых продуктов можно разделить на требования к продукту в качестве продукта питания и в качестве объекта торговли с участием людей, как потребителей. Важность каждого требования оценить сложно, поскольку они взаимосвязаны и зависят от точки зрения потребителя/ритейла. С одной стороны, продукт может быть отклонен, если одно требование имеет серьезные недостатки, даже если все остальные требования выполнены. С другой стороны, превышение ожиданий только по одному требованию может быть достаточно для успеха продукта. Однако недостатки одного требования могут быть компенсированы отличным качеством другого требования. Например, продукт может иметь низкие вкусовые характеристики, но обладать высокой пищевой ценностью, или наоборот, высокие органолептические качества могут нивелировать пониженные питательные свойства [Peri, 2006].

Качество пищевых продуктов — это еще более сложная задача, чем сочетание требований, потому что необходимо учитывать различные заинтересованные стороны. Таким образом, динамическая модель качества пищевых продуктов вращается по кругу: потребители выражают ожидания (требования); этим требованиям должен соответствовать продукт (производительность); эта производительность должна определяться его характеристиками, и эти характеристики окончательно контролируются в процессе производства. В данном контексте объективные характеристики – это структурные данные продукта (например, форма, вес, размер, состав), тогда как субъективные

характеристики – это функциональные данные (восприятие продукта потребителем). И объективные, и субъективные концепции вместе составляют два столпа общего качества пищевых продуктов [Giusti et al., 2008].

Безопасность пищевых продуктов, безусловно, является неотъемлемой частью качества пищевых продуктов, но их нельзя путать. Согласно ISO 22000: 2018 термин «безопасность пищевых продуктов» охватывает все меры, обеспечивающие безопасность продукта для потребления человеком и отсутствие опасностей, которые могут причинить вред потребителю, когда он готовится и / или употребляется в соответствии с его предполагаемым использованием [Purwanto et al., 2019]. Более конкретно, безопасность пищевых продуктов относится к защите цепочки создания стоимости пищевых продуктов от непреднамеренного загрязнения, тогда как защита от преднамеренной фальсификации с целью причинения вреда называется защитой пищевых продуктов [Manning and Soon, 2016]. Несмотря на то, что согласно многочисленным литературным источникам протеомика рассматривается как инструмент для обеспечения безопасности пищевых продуктов и выявления потенциальных фальсификаций [Andjelkovic and Josic, 2018; Cunsolo et al., 2014; D'Alessandro and Zolla, 2012; Josic et al., al., 2017; Korte and Brockmeyer, 2017; Martinovic et al., 2016; Ortea et al., 2016; Piras et al., 2016], в данной работе протеомные методы будут использованы для изучения вариаций основных групп мышечных белков, участвующих в процессах роста и развития животного, а также модифицируемых белков после различных температурных воздействий на мясное сырье и продукты.

Благодаря своей универсальности, беспрецедентной скорости, улучшенной точности и глубине охвата, методы протеомики идеально подходят для изучения качества пищевых продуктов с учетом различных требований, характеристик и критериев. С помощью протеомных методов можно идентифицировать белки в пищевой матрице, изучать белок-белковые взаимодействия во время обработки пищевых продуктов и выяснять взаимодействия между белками и другими составляющими пищи. Образование ковалентно связанных ПТМ, которые

приводят к изменениям в структуре белка, может быть локализовано на определенных аминокислотных остатках за счет характерного сдвига в соотношении m/z и паттернах фрагментации [Lexhaller et al., 2019]. Сравнительная протеомика также подходит для выявления не ковалентных белковых взаимодействий [Carbonaro, 2004; Mora et al., 2018]. Различные практические применения протеомики помогают выявить изменения от сырья в цепочке создания стоимости до производства и потребления пищевых продуктов, а также до биологических функций пищевых белков у людей. Спектр исследований, связанных с качеством пищевых продуктов, варьируется от изучения влияния стрессовых факторов окружающей среды на белковый состав пищевого сырья, таких как биотические (например, патогены, вредители) и абиотические (например, засуха, наводнение, засоление), до производственных факторов (совершенствование обработки пищевых продуктов и техники, условия хранения). Обзор примеров применения протеомики для изучения качества пищевых продуктов будет обсуждаться далее более подробно.

1.2. Современные протеомные подходы и методы к изучению пищевых продуктов

В зависимости от научной задачи протеомные исследования могут быть разделены на три основные категории: качественная, количественная и функциональная протеомика. Качественная протеомика направлена на идентификацию и определение характеристики белков в пищевом продукте, включая изучение всех белков или какой-то определенной подгруппы белков, представляющих особый интерес, например, казеины в молочных продуктах, гликолитические ферменты в мясе или пищевые аллергены в сырье и продуктах питания. Основными методами качественной протеомики являются масс-спектрометрические (масс-спектрометрии (МС, МС/МС)). В частности, «Bottom-up» подходы, такие как фингерпринт пептидной массы (PMF) [Pappin et al., 1993] и пептидная фрагментация (PFF) [Eng et al., 1994], основаны на ферментативном гидролизе белков перед анализом. При использовании подходов «top-down», наоборот, не требуется ферментативный гидролиз, поскольку интактные белки

фрагментируются непосредственно внутри прибора при получении данных с помощью тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) [McLafferty et al., 2007].

Данные подходы основаны на сопоставлении полученных спектров МС или МС/МС с базами данных белков. Доступные в настоящее время базы данных белков, такие как NCBI Protein (Национальный центр биотехнологической информации, Национальная медицинская библиотека США, Бетесда, Мэриленд, США) или UniProtKB (Консорциум UniProt, 2019), часто не включают исчерпывающую информацию о последовательности множества белков растительного, животного и /или грибкового происхождения, присутствующих в пищевых продуктах. В связи с этим надежная идентификация белков является очень сложной задачей и часто требует тщательной ручной обработки данных. Ферментативные ПТМ, например, фосфорилирование, ацетилирование или гликозилирование, а также неферментативные ПТМ, вызванные процессами, происходящими во время обработки и хранения, например, гликирование Майяра, конденсация, устранение боковых цепей и окисление тиолов, еще больше усложняют идентификацию белков в пищевых продуктах [Pischetsrieder и Baeuerlein, 2009; Yu et al., 2017].

Количественная протеомика направлена на относительное количественное определение конкретных белков при сравнении между различными образцами, а также абсолютное определение точных концентраций белка. Классическое применение количественной протеомики – исследования вариаций протеома пищевых продуктов, вызванных естественным изменением сырья (автолизом), технологической обработкой и хранением. Для относительного количественного определения протеомного состава применяются различные методики на основе гель-электрофореза с использованием меток и без меток, идентификация белков в пятне с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с МС/МС.

Рабочие процессы, как правило, начинаются с разделения белков с помощью двумерного гель-электрофореза (2-DE), оценки концентраций белка на основе объемов пятна, с последующей оценкой идентичности белков в пятне с помощью

ВЭЖХ-МС/МС. Во многих случаях относительное количественное определение белкового состава достигается с помощью масс-метчиков, например, диметил мечение [Boersema et al., 2009], изотопной метки к N-концу пептида или белка (iTRAQ) [Ross et al., 2004] или тандемные масс-метки (TMT) [Thompson et al., 2003] для первичных аминов. Для количественного определения без метки используются такие методы оценки, как площадь под кривой на основе площади пика спектров ионов-предшественников, либо спектральный подсчет, основанный на подсчете количества пептидов в конкретном белке в МС/МС эксперименте [Neilson et al., 2011]. По сравнению с относительным количественным определением белка, абсолютное имеет преимущества, позволяющие проводить перекрестное сравнение данных как между экспериментами и лабораториями, так и между масс-спектральными платформами и видами организмов. Однако для него требуется эталон/стандарт с известной абсолютной концентрацией. Обычно используемые стандарты представляют собой синтетические пептиды AQUA (для «абсолютного количественного определения»), по крайней мере, с одной [15N]- и [13C]-стабильной изотопной меченой аминокислотой [Kettenbach et al., 2011], конкатенированные пептиды с включением [13C]- и/или [15N]- лизин и аргинин (QconCAT) [Pratt et al., 2006], или меченые белки, синтезированные *in vitro* в присутствии [13C] и/или [15N] лизина и аргинина (абсолютное количественное определение стандарта белка, PSAQ) [Brun et al., 2007].

Функциональная протеомика изучает белок-белковые взаимодействия, взаимодействия между белком и другими молекулами, а также последствия этих взаимодействий [Kiemer and Cesareni, 2007]. Функциональные подходы используют значения активности образцов протеаз для определения белкового профиля [Serim et al., 2012]. Визуализация масс-спектров – полезный инструмент для выявления локализации белков в ткани, чтобы лучше понять функциональность белка. Данные подходы часто используются для изучения тканей [Stoeckli et al., 2001], в фармацевтических исследованиях [Andersson et al., 2008], при разработке лекарств [Schulz et al., 2019] и в биологии растений [Grassl et al., 2011]. Однако их применение в протеомике пищевых продуктов встречается

довольно редко [Yoshimura et al., 2016], и на данный момент проводились исследования только для белков-переносчиков липидов в плодах [Cavatorta et al., 2009] и томатах [Bencivenni et al., 2014].

Методологически протеомика пищевых продуктов начинается с процесса подготовки образца, отличный для разных объектов. Далее следует один или несколько этапов разделения белков/пептидов перед масс-спектрометрическим анализом. При работе со сложными пищевыми продуктами подготовка образцов обычно включает извлечение белка, очищение от наиболее распространенных мешающих белков, выборочное концентрирование или частичное выделение представляющих интерес белков, присутствующих в образце в сравнительно небольшом количестве [Martínez-Maqueda et al., 2013; Schalk и др., 2017]. Затем выполняются дальнейшие этапы разделения на уровне белка и/или пептида с использованием электрофореза в ПААГ, таких как изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) и/или электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), или без предварительного разделения в ПААГ (например, ВЭЖХ-МС/МС) (рисунок 1).

Таким образом, протеомные эксперименты делятся на рабочие процессы снизу вверх «Bottom-up» (протеомика, основанная на пептидах) и сверху вниз «Top-down» (протеомика, основанная на белках). Для «Bottom-up» рабочих процессов применяют ферментативный, обычно триптический, гидролиз белков с последующим МС-анализом полученных пептидов. Селективное обогащение интересующих мишеней выполняется на уровне белка или пептида, то есть до или после ферментативного гидролиза. «Top-down» осуществляется с применением 2-DE, который сочетает разделение белков в соответствии с изоэлектрической точкой (pI) с помощью ИЭФ и разделение по относительной молекулярной массе (Mr) с использованием SDS-PAGE. Затем белковые пятна вырезают из геля, гидролизуют с использованием специфического фермента расщепления, а пептиды анализируют с помощью масс-спектрометрических методов. Если селективное обогащение выполняется на уровне пептидов, белковая смесь гидролизуется непосредственно без предварительной очистки белков, и пептиды разделяются с

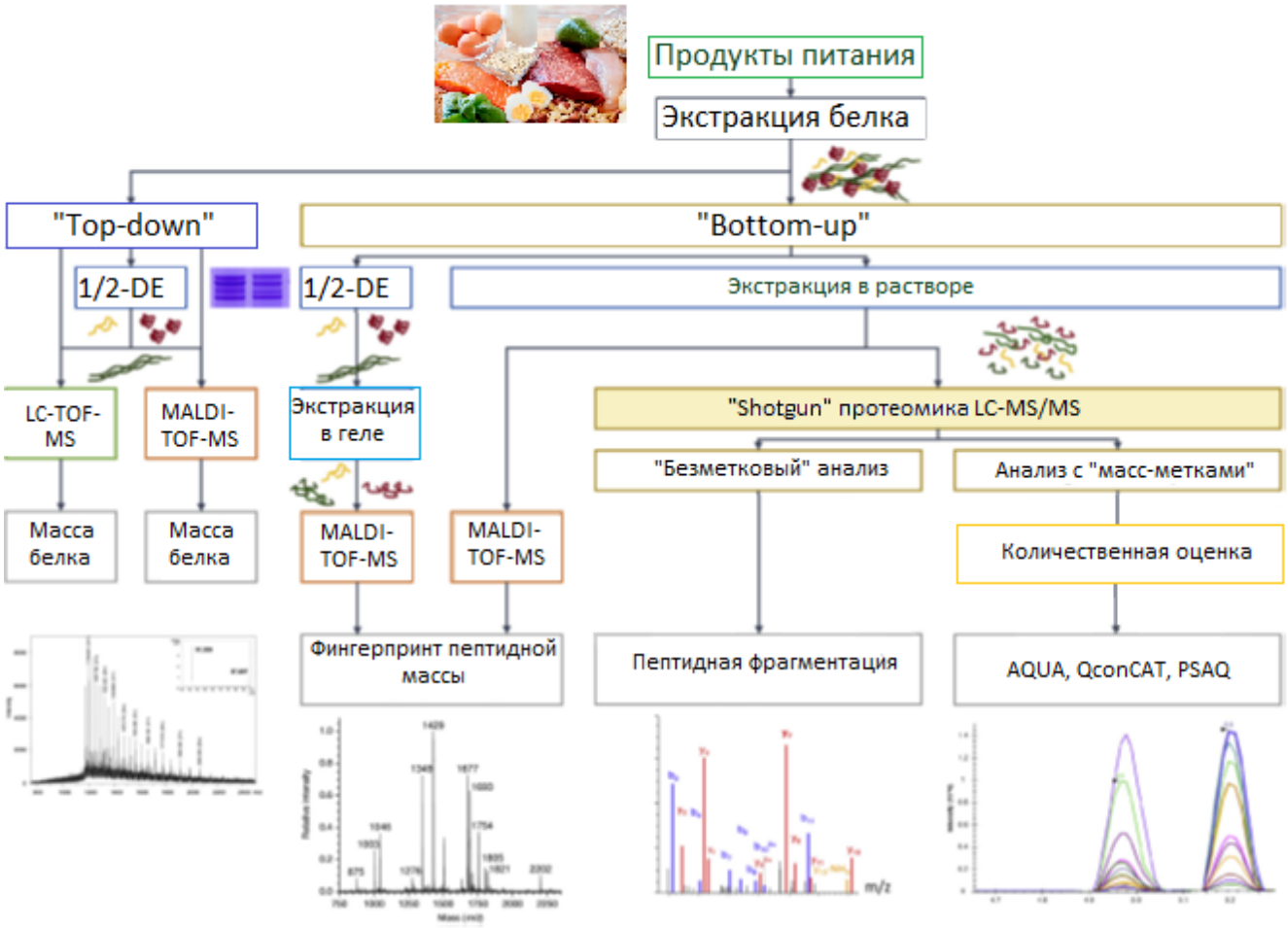


Рисунок 1– Методологические процессы протеомики, используемые для оценки качества пищевых продуктов. 1/2-DE - 1/2-мерный гель-электрофорез, AQUA - абсолютное количественное определение, QconCAT - конкатемеры, LC-TOF-MS (ВЭЖХ-МС/ВП) - высокоэффективная жидкостная хроматография с времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием, MALDI (МАЛДИ) - Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, PSAQ - Абсолютное количественное определение стандарта белка. Изменено из Ortea et al. [2016].

помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (УЭЖХ/МС) или нано-ВЭЖХ-МС/МС, которая позволяет анализировать смеси пептидов в условиях ограниченного количества образцов (например, протеолитически расщепленные белки, выделенные с помощью двумерного гель-электрофореза).

Идентификация белков на основе PMF часто выполняется с помощью гель-электрофореза или ВЭЖХ, впоследствии белки расщепляются эндопротеазами. Полученные пептиды исследуют путем определения молекулярных масс или

образования пептидных фрагментов. Для идентификации белков экспериментально полученные массы сравниваются с теоретическими массами пептидов белков, хранящихся в базах данных, с помощью программ массового поиска [Thiede et al., 2005].

Следовательно, PMF не применим к белковым смесям с более чем двумя или тремя белками и подходит только для избранных применений в протеомике пищевых продуктов. Некоторые примеры успешного применения времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации масс-спектрометрии включают обнаружение сухого молока в свежем коровьем молоке [Calvano et al., 2013] и дифференциацию съедобных насекомых [Ulrich et al., 2017]. PFF предоставляет больше информации о пептидах, поскольку он использует хроматографическое разделение, связанное с тандемным масс-спектрометром, например, тройной квадруполь (QQQ), квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр (QTOF). В MC/MC неповрежденные пептиды сначала разделяются по соотношению их массы к заряду (m/z) в первом масс-анализаторе (MC1) с последующей фрагментацией выбранных ионов с использованием диссоциации, индуцированной столкновениями (CID), захвата/переноса электронов, диссоциации или фотодиссоциации и обнаружения соответствующих ионов продукта по их соотношению m/z во втором масс-анализаторе (MC2) [Eng et al., 1994].

По сравнению с «Bottom-up», «Top-down» обеспечивает более точную идентификацию белков на основе уникальных ионов продукта, а также более обширную и конкретную информацию о структурах белков, включая полиморфизмы или ПТМ. Однако его применение в пищевых продуктах до сих пор было ограничено, потому что для этого требуются дорогостоящие приборы с высокой разрешающей способностью, например, масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-ICR) и с использованием диссоциации при захвате электрона (ECD) или масс-спектрометр с орбитальной ионной ловушкой (OrbiTrap). Кроме того, разделение смесей, содержащих более десяти белков, является сложной задачей, особенно если количества сильно

варьируются в пределах образца, а большие белки (Mr> 50 000 Да) дают мало ионов продукта из-за низкой эффективности ионизации и диссоциации [McLafferty et al., 2007].

Подготовка образцов

Первым шагом в протеомном анализе является извлечение белков из продуктов питания. В зависимости от состава образца параметры экстракции необходимо адаптировать для максимального извлечения представляющих интерес белков, удаления мешающих веществ и минимизации модификаций белков. Обычными реагентами для солюбилизации и стабилизации белков являются буферы, такие как 2-амино-2-(гидроксиметил) пропан-1,3-диол (трис (гидроксиметил) аминометан, TRIS), 2-[4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-ил] этансульфоновая кислота (HEPES) или 3-морфолинопропан-1-сульфоновая кислота (MOPS), восстановители, такие как (2S, 3S)-1,4-бис (сульфанил) бутан-2,3-диол (дитиотреитол), DTT), 2-сульфанилэтан-1-ол (2-меркаптоэтанол, BME) или 3,30,300-фосфантриилтрипропановая кислота (трис (2-карбоксиэтил) фосфин, TCEP) и денатурирующие агенты, такие как мочевина, SDS или 3-[(3-холамидопропил) диметиламмонио]-1-пропансульфонат (CHAPS). Могут потребоваться дополнительное внесение различных соединений, таких как ДНКазы, для удаления нуклеиновых кислот и ингибиторов протеаз, например, фенилметансульфонилфторид (PMSF) или 2,20,200,2000- (этан-1,2-дилдинитрило) тетрауксусная кислота (ЭДТА) [Martínez-Maqueda et al., 2013]. В дополнение к вышеупомянутым агентам можно использовать различные протоколы экстракции по отдельности или в комбинации (например, органические растворители [Schalk et al., 2018], ферментативная экстракция [Hernández-Ledesma et al., 2004], обработка ультразвуком, жидкий азот, прессование/расширение и/или механическое измельчение с использованием мельниц, смесителей, гомогенизаторов, вихревых смесителей или ручного измельчения с помощью ступки и пестика). Важно обеспечить совместимость метода экстракции с объемом образца, который необходимо извлечь с последующей обработкой образца и измерением МС.

После экстракции белка часто требуется очистка и концентрирование белка. Широко распространенными методами концентрирования белка являются: осаждение (например, с использованием сульфата аммония, трихлоруксусной кислоты/ацетона или спиртов) [Duong-Ly and Gabelli, 2014; Koontz, 2014], центрифугирование, фильтрация (например, ультрафильтрация, диализ) и/или лиофилизация [Goldring, 2019]. Чтобы уменьшить количество примесей в образце и увеличить долю целевых белков, чаще всего используются такие методы фракционирования, как хроматография (например, обращенно-фазовая, гель-проницаемая, ионный обмен) или 1/2-DE. Недавно библиотеки комбинаторных пептидных лигандов на основе гранул (CPLL) [Boschetti et al., 2009; Thulasiraman et al., 2005] были успешно применены для увеличения относительных пропорций белков с низким и очень низким содержанием, например, в алкогольных [Cilindre et al., 2014] и безалкогольных [Fasoli et al., 2011] напитках, фруктах [Esteve et al., 2012a], семенах [Esteve et al., 2012b] и яичных белках [D'Ambrosio et al., 2008].

Следующим и очень важным шагом в «Bottom-up» протеомике является гидролиз белка либо в геле после электрофореза, либо непосредственно в растворе смеси белков. Трипсин чаще всего используется в качестве гидролитического фермента из-за его широкой доступности, простоты использования и высокоспецифичного расщепления на С-конце лизина и аргинина с образованием пептидов, которые легко ионизируются в режиме положительного ESI. Однако использование одного трипсина может привести к неполной картине всего протеома, потому что некоторые белковые сегменты могут быть упущены из-за присутствия ПТМ или отсутствия лизина/аргинина в аминокислотной последовательности, как это обычно бывает, например, белки злаков [Colgrave et al., 2017; Lexhaller et al., 2019]. Вот почему альтернативные протеазы, такие как химотрипсин, LysC, LysN, AspN, GluC и ArgC, исследуются на предмет их пригодности для предоставления дополнительной информации о протеоме пищевых продуктов [Giansanti et al., 2016].

Разделение белков/пептидов, анализ и оценка данных

Постоянное повышение эффективности разделения ЖХ в сочетании с увеличением разрешения МС и скорости сбора данных, приводят к тому, что рабочие процессы протеомики имеют тенденцию отходить от гелевых подходов к безгелевым процедурам [Jorrín-Novo et al., 2015]. Однако ИЭФ, SDS-PAGE и особенно 2-DE в сочетании с МС являются проверенными и хорошо зарекомендовавшими себя методами, которые широко используются в различных протеомных исследованиях пищевых продуктов для оценки качества белка [Zarkadas et al., 2007], непреднамеренных протеомных изменений в генетически модифицированных культурах [Ruebelt et al., 2006], для отслеживаемости и аутентификации [Terova et al., 2014], выявления изменений белка во время хранения [Lametsch et al., 2002] и фальсификации [Skylas et al., 2001]. Хотя 2-DE хорошо подходит для картирования паттернов белков, также известно, что только 30 – 50 % всего протеома выявляются с помощью 2-DE из-за высокой сложности, ограниченного динамического диапазона концентраций белка и низкой эффективности разделения очень больших и/или гидрофобных белков [Baggerman et al., 2005]. 2D-DIGE с использованием двух или трех ярких флуоресцентных красителей позволяет сравнивать два образца (и третий образец в качестве внутреннего стандарта) на одном и том же геле, тем самым уменьшая вариации от геля к гелю и позволяя более точно определять небольшие различия между выборками [Ackermann D. et al., 2012].

Для анализа более тысячи белков/пептидов в одном эксперименте чаще всего используются безгелевые протеомные стратегии [Lambert et al., 2005]. В настоящее время комплексные протеомные исследования часто сочетают подходы на основе геля и без геля, потому что оба эксперимента предоставляют дополнительную информацию, особенно для более точного обнаружения и локализации ПТМ [Arena et al., 2017; Bazile et al., 2019].

Независимо от стратегии сбора данных МС/МС, необходим крупномасштабный анализ данных с использованием различных биоинформатических инструментов, например, MaxQuant [Cox and Mann, 2008],

OpenMS [Röst et al., 2016], PEAKS [Zhang et al., 2012], Progenesis QI [Moseley et al., 2018], Proteios [Gärdén et al., 2005] или Skyline [Schilling et al., 2012] для правильной интерпретации. В общем, сравниваются экспериментальные данные МС с расчетными значениями массы, полученными из базы данных последовательностей белков с использованием специальной поисковой системы, такой как Andromeda, Mascot, MS-Fit, ProFound или MassSearch [Cunsolo et al., 2014]. Успешная идентификация белка требует наличия в данных соответствующей последовательности белка. Если белок отсутствует, пептиды будут соответствовать записи с наиболее близкой гомологией, принадлежащей близкородственным видам. Но, если гомологичная последовательность не обнаружена, данные МС/МС необходимо интерпретировать путем секвенирования *de novo* в сочетании с алгоритмами поиска в базе данных, такими как BLAST, FASTA или MSBLAST [Tamura et al., 2011].

Из-за высокой сложности и вариативности протеомных экспериментов Human Proteome Organization-Proteomics Standards Initiative (HUPO-PSI) [Martens et al., 2007] разработала рекомендации по соответствующему дизайну протеомных экспериментов, правильному сбору данных, метаданным, а также требования к обработке данных и статистическому анализу. Эти «минимальные сведения о протеомном эксперименте» (MIAPE) направлены на обеспечение сопоставимости, обмена и подтверждения протеомных данных [Taylor et al., 2007].

1.3. Современные знания о протеомных исследованиях мяса и мясных продуктов

Производство мяса увеличивается в мировом масштабе. При этом наиболее важными продуктивными животными являются свиньи ($1{,}21\times10^8$ т), куры ($1{,}14\times10^8$ т) и крупный рогатый скот ($0{,}67\times10^8$ т). Далее следуют овцы, козы и индейки ($0{,}38\times10^8$ т в 2018 г.) [FAOSTAT, 2020]. Наряду с водой, мышечные белки (около 20 %) представляют собой основные составляющие мяса и по растворимости классифицируются на солерастворимые миофибриллярные белки (45–55 %), водорастворимые саркоплазматические (30–35 %) и белки соединительной ткани (10–15 %), растворимые в разбавленных кислотах [Geisslitz et al., 2020].

Миофибриллярные белки включают все белки, участвующие в сократительном действии (миозин, актин, тропомиозин, тропонин, актинин) и в каркасе (тайтин, десмин, небулин). Саркоплазматические белки включают миоглобины, которые отвечают за хранение кислорода в мышцах, и различные ферменты, которые в основном участвуют в гликолитическом пути. Соединительная ткань окружает мышечные волокна и образована коллагеном, ретикулином и эластином [Di Luccia et al., 2017]. Мышечные белки организованы в сложные надмолекулярные структуры, позволяющие сокращаться за счет преобразования химической энергии из питательных веществ в механическую. Переход от мышц к мясу через фазу трупного окоченения сопровождается снижением pH и ферментативным действием цитоплазматических и лизосомных ферментов, разрушающих эти надмолекулярные структуры. В свою очередь, начинают проявляться несколько связанных с качеством мяса атрибутов, определяющих вкусовые качества: нежность, сочность (т.е. влагоудерживающая способность, ВУС), цвет и вкус, которые являются наиболее важными для потребителей [Wu et al., 2015]. Однако качество мяса – это сложная характеристика, зависящая от структурных и химических свойств соединительной ткани, отложения жира в мышцах, размера миофибрилл и состава мышечных волокон, которые также влияют на биохимические процессы во время преобразования мышц в мясо [Pearce et al., 2011]. Из-за огромного разнообразия факторов, начиная от возраста, пола, скорости роста, физической активности, системы выращивания, условий кормления и породы животных до предубойной подготовки, техники убоя, сложно отследить качество мяса [Bendixen, 2005; D'Alessandro, Zolla, 2013]. Кроме того, мясо обычно подвергают тепловой обработке перед употреблением, и это приводит к денатурации и коагуляции миофибриллярных белков, а также к превращению коллагена в желатин, что приводит к тендеризации.

Для изучения клеточных и молекулярных механизмов, определяющих качество мяса и мясных продуктов, использовалось множество протеомных подходов с целью выявления белковых маркеров, которые можно использовать для мониторинга и прогнозирования качества [Picard et al., 2012]. Каждый из

различных аспектов протеомики качества мяса, по существу, требует специального обзора. В связи с этим недавно были обобщены соответствующие результаты исследований, касающиеся благополучия животных, пород и производственных аспектов [Bassols et al., 2017], преобразования мышц в мясо [D'Alessandro and Zolla , 2013], цвета свежего мяса [Nair et al., 2017], нежности [Picard and Gagaoua, 2017], мясных продуктов [Di Luccia et al., 2017; Paredi et al., 2018], дефектов качества мяса [Schilling et al., 2017] и качества мяса в целом [Capozzi et al., 2017; Nair and Zhai, 2020]. Поэтому следующая часть будет посвящена нескольким недавним примерам, связанным с формированием мышц, цветом мяса, ВУС, нежностью и технологической обработкой.

Процесс формирования и наращивания мышечной ткани (гипертрофия) является важным генетическим признаком сельскохозяйственных животных, поскольку в конечном итоге определяет степень превращения корма в мышечную массу. В качестве первого шага были изучены механизмы, контролирующие миогенез, у крупного рогатого скота (КРС), свиней и цыплят на разных этапах: от (1) пролиферации (роста клеток) первого поколения миобластов, (2) дифференцировки первого поколения и пролиферации второго поколения миобластов, (3) завершения процесса пролиферации миобластов и дифференцировки в мышечные трубки до (4) созревания мышечных трубок и волокон [Picard et al., 2010]. Быстрый рост мышц обычно был связан с увеличением доли быстро сокращающихся гликолитических волокон и соотношения между экзоном 16 быстрого тропонина T (fTnT) и экзоном 17 fTnT, который был определен как подходящий маркер развития мышечной массы [Bouley et al., 2005].

Одним из важнейших критериев качества является цвет, по которому потребители могут судить о свежести мяса и решать покупать продукт или нет. Цвет определяется равновесием между окислительно-восстановительными формами дезоксимиоглобина (пурпурно-красный), оксимиоглобином (вишнево-красный) и метмиоглобином (коричневый), которые являются результатом окисления миоглобина, вызванного окислением липидов, и последующего обесцвечивания мяса. В качестве типичного продукта окисления липидов 4-

гидрокси-2-ноненаль (HNE) часто используется для изучения механизмов реакции перикисного окисления, при этом LC-MS/MS используется, чтобы выявить, что HNE образует ковалентные аддукты со специфическими гистидиновыми остатками миоглобина, тем самым ставя под угрозу стабильность миоглобина [Alderton et al., 2003]. В нескольких исследованиях также изучались различия в молекулярных массах и первичных структурах миоглобина разных видов, связанные с функциональностью и стабильностью цвета [например, Dosi et al., 2012; Joseph et al., 2015]. Саркоплазматические белки также важны для цвета мяса, поскольку взаимодействуют с миоглобином. Сравнительная протеомика саркоплазматических белков из *longissimus lumborum* (LL, цветоустойчивая мышца) и *muscle psoas* (PM, цветоустойчивые мышцы) в задних конечностях крупного рогатого скота показала, что LL имеет более высокое содержание метаболических ферментов, антиоксидантных белков и шаперонов, чем в PM. Выявлена положительная корреляция сверхэкспрессии альдозоредуктазы, креатинкиназы и бета-енолазы с красным цветом, тогда как пероксиредоксин-2, дигидроптеридинредуктаза и белок теплового шока (HSP) -27 были положительно связаны со стабильностью цвета [Joseph et al., 2012]. Дальнейшие исследования были сосредоточены на различиях внутри мышцы *semimembranosus* КРС, которая более стабильна по цвету снаружи, чем внутри [Nair et al., 2016]. Canto et al. [2015] идентифицировали несколько метаболических ферментов, которые были связаны со стабильностью цвета говяжьей LL, изучая вариации от животного к животному, а Marino et al. [2014] оценили влияние породы КРС и возраста на цвет и профили саркоплазматических белков. Аналогичные исследования были проведены в отношении свинины [Sayd et al, 2006]. Исследования куриного мяса до сих пор были сосредоточены на выявлении различий между нормальной грудкой бройлеров и PSE грудкой. Дефект PSE был связан с переизбытком белков, участвующих в гликолитических путях, сокращении мышц, протеолизе, регенерации АТФ и энергетическом метаболизме [Desai et al., 2016].

Следующий важнейший атрибут качества мясных продуктов – ВУС. Хорошо известными дефектами, особенно свинины, является DFD или PSE мясо, оба

характеризующиеся худшей ВУС. Сравнительная протеомика использовалась для отслеживания изменений, приводящих к DFD говядине, связанных с предубойным стрессом. Исследования *l. dorsi* КРС показали, что семь структурно-сократительных белков (различные изоформы миозина, тропонина С типа 2 и кофилин-2) и три метаболических фермента подвергались статистически значимым количественным изменениям [Franco et al., 2015]. В свинине идентифицированы три белка-маркера для ВУС и связанной с этим потери влаги, а именно креатинфосфокиназа М-типа (CPK), десмин и активатор транскрипции (связанный с SWI/SNF матрикс-зависимый актин-зависимый регулятор хроматина подсемейства A member1, SNF2L1) [van de Wiel and Zhang, 2007]. Дальнейшая работа над изучением белков свинины с различной ВУС привела к идентификации многих метаболических ферментов, нескольких белков, связанных со стрессовой реакцией, и некоторых структурных и транспортных белков. HSP70 представлял особый интерес как потенциальный биомаркер ВУС в свинине, потому что его повышенная экспрессия могла играть защитную роль от денатурации и агрегации белка с уменьшением потери влаги [Di Luca et al., 2013]. Последующее исследование фенотипов, характеризующихся высокой и низкой потерей влаги, обнаружило несколько метаболических ферментов (фосфоглюкомутаза 1, триозофосфатизомераза, энолаза), белков окислительного стресса (белок DJ-1, пероксиредоксин 6, HSP70, стресс-индуцированный фосфопротеин 1), структурных белков (тайтин, миозинсвязывающий белок С, быстрого типа) и транспортных белков (белок CutA, аполипопротеин AI, гемопексин), которые экспрессируются дифференцированно. Из них новый белковый маркер (антистресс-индуцированный фосфопротеин 1, анти-STIP1) был признан прогностическим фактором потери жидкости из организма [Di Luca et al., 2016].

Нежность мяса обусловлена ослаблением миофибрилл и соединительных тканей эндогенными пептидазами, в основном лизосомальными протеазами, катепсинами, кальпаинами и протеасомами, но результаты различных исследований не всегда согласованы из-за сложности связанных метаболических путей и биохимических реакций [Wu et al. др. 2015]. Функциональное

интерактомное картирование маркеров нежности говядины показало, что H2AFX (гистон, участвующий в клеточном ответе на повреждение ДНК), SUMO4 (небольшой убиквитиноподобный модификатор 4, ответственный за защиту ДНК от стресса) и TP53 (фактор транскрипции, способствующий апоптозу) были важны, как центральные звенья между HSP, метаболическими белками, структурными белками и протеолитическими ферментами [Guillemin et al., 2011]. Дополнительный протеомный анализ подтвердил связь H2AFX с нежностью говядины [D'Alessandro and Zolla, 2013]. Было идентифицировано множество потенциальных биомаркеров нежности говядины, включая HSP, белки, участвующие в гликолитическом или окислительном метаболизме, окислительном стрессе, транспорте и передаче сигналов, апоптозе, протеолизе, структуре и сокращении мышц [Picard and Gagaoua, 2017]. Сетевой анализ когерентной корреляции выявил устойчивые корреляции между белком DJ-1 и пероксиредоксином 6 с HSP20 и м-кальпаином, соответственно [Gagaoua et al., 2015], что подтверждает предыдущую работу по выбору протеомными маркерами нежности [Jia et al., 2009; Morzel. и др., 2008].

Мясо либо употребляется в сыром виде, либо после различных методов технологической обработки, (соление, сушка, варка или жарка), которые приводят к значительным изменениям белков мяса. Несмотря на общую применимость протеомики для изучения изменений протеома мяса после технологической обработки, до сих пор было проведено сравнительно мало исследований в этой области [Di Luccia et al., 2017; Paredi et al., 2018]. Гидротермальная обработка образцов говяжьего фарша вызвала общее снижение уровня незаменимых аминокислот и устойчивое увеличение показателя окислительной модификации, коррелированного со временем и площадью поверхности теплового воздействия. Окислительно-восстановительная протеомика, применяемая для идентификации окислительных модификаций белков, показала, что окисление фенилаланина и образование хинона из тирозина происходили при увеличении температуры. Также были обнаружены продукты реакции Майяра. При этом установлено, что миозин наиболее подвержен реакциям с восстанавливающими сахарами [Deb-Choudhury et

al., 2014]. Исследования влияния различных способов приготовления, например, на водяной бане, кратковременного и длительного омического нагрева, на качество и протеом *latissimus dorsi* КРС показали, что повреждение белков было выше после приготовления на водяной бане по сравнению с омическим нагревом. Различия в содержании белка были выявлены в основном в миофибриллярных белках, что может объяснить более высокую нежность, более интенсивное покраснение и более высокую ВУС мяса, нагретого омическим нагревом, по сравнению с обычным нагревом [Tian et al., 2016].

Касаемо продуктов из свинины, то большинство исследований до сих пор было сосредоточено на изменении протеома свинины от свежего мяса до вареной или вяленой ветчины. Прогрессивный гидролиз легких цепей актина, тропомиозина и миозина во время созревания хамона (сыровяленой ветчины) определен с помощью 2-DE и MALDI-TOF-MS [Di Luccia et al., 2005]. Безметковый МС для относительного количественного определения саркоплазматических белков во время созревания сыровяленой ветчины показал значительное снижение двадцати гликолитических ферментов и саркоплазматических белков. Используя эти двадцать белков, также можно было различать образцы с первых стадий созревания и образцы после 5, 6 и 9 месяцев хранения [Gallego et al., 2016]. Протеомный анализ сырого и приготовленного мяса, а также мясных продуктов из говядины, свинины, мяса курицы, индейки, утки и гуся выявил значительные межвидовые различия в первичных структурах белков плазмы крови, – в сывороточном альбумине и аполипопротеине B. Высокая дифференциация наблюдалась также в HSP27 и связывающем жирную кислоту белке сердечного типа (H-FABP) (регуляторные белки), а также в АТФ-синтазе, субъединице 1 цитохрома bc 1 и субъединице флавопротеина с переносом электронов альфа (a-ETF) (метаболический ферменты). Поскольку исследование было сосредоточено на белках, которые остаются относительно стабильными при старении и лишь незначительно разлагаются при технологической обработке, эти белки могут быть подходящими в качестве маркеров для различных видов мясных продуктов [Montowska and Pospiech, 2013].

1.4. Заключение по обзору научно-технической литературы

Интенсификация производства мяса и мясных продуктов приводит к повышенному вниманию к качеству сырья, которое имеет важное значение для промышленности. При этом нежность и сочность являются наиболее важными признаками для потребителей. Многочисленными исследованиями выявлено, что на эти признаки оказывает влияние генетика, факторы окружающей среды, условия содержания животных и дальнейшая обработка. По-прежнему вызывает интерес молекулярные механизмы, лежащие в основе процессов формирования качества. Однако генетическая информация остается постоянной в течение жизни организма, в то время как белковый состав довольно динамичен и меняется в зависимости от факторов, влияющих на синтез или деградацию белка. Таким образом, изучение протеома, экспрессируемого из генома в текущих условиях окружающей среды или изменяемого при переработке дает возможность прогнозировать функционально технологические свойства мяса.

На сегодняшний день инструментарий протеомики значительно усовершенствован, стремительно развиваются масс-спектрометрические методы. Большинство протеомных методов основано на разделении белков по меньшей мере в двух направлениях: с использованием хроматографических или электрофоретических методов с дальнейшей идентификацией методами масс-спектрометрии. В данной работе внимание направлено на метод двумерного гель-электрофореза, поскольку он до сих пор является отличным способом визуализации белковой составляющей и широко используется в науке о мясе, с акцентом на пробоподготовку и аспекты изоэлектрофокусирования при выполнении 2-ДЭ.

Одновременно с этим в условиях огромного потока информации о том, что количество и качество потребляемых мясных продуктов значительно влияют на состояние здоровья человека, потребители желают знать точную информацию о составе мясопродуктов.

Отдельно стоит отметить увеличение случаев фальсификации мясных продуктов с использованием мяса от других животных, белковых и прочих добавок, не предусмотренных технологией производства. В связи с этим, контроль мясной продукции, а также сырья, является важным вопросом.

Таким образом, особую актуальность приобретает разработка надежных и высокопроизводительных методов, позволяющих идентифицировать и определять отдельные компоненты сложных пищевых систем. За последние десять лет в области протеомики мяса наблюдался устойчивый рост научного интереса. Было проведено большое количество исследований, направленных на определение видовой и половой принадлежности мясного сырья, влияние автолитических и технологических процессов на белки мяса, определение количественного содержания «мясных» белков и многое другое. Отдельно стоит отметить открытие белков-маркеров для различных атрибутов качества мяса.

Проведённый анализ научно-технической литературы показал, что протеомике пищевых продуктов уделяется все больше внимания ввиду уникальности методологических подходов. Однако, с помощью адаптации существующих методов протеомики для мяса и мясных продуктов возможно расширить и актуализировать имеющуюся информацию об изменениях белков, которые можно использовать на практике в мясной промышленности. В связи с этим поставленные цель и задачи являются актуальными и подтверждают научную новизну данной работы.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В соответствии с целью и задачами диссертационной работы объектами исследования являлись:

1) образцы мышечной ткани:

- *longissimus dorsi* (*l. dorsi*) свиньи;

- *l. dorsi, biceps femoris (b. femoris) и muscle brachiocephalicus (m. brachiocephalicus)* поросят-отъемышей возрастом 60 сут. и половозрелых свиней возрастом 180 сут., гибридов вьетнамской вислобрюхой и Визенау, отобранных в питомнике ООО «Кролинфо» (Ликино-Дулево, Россия);

2) модельные фарши, изготовленные из *l. dorsi*:

- с разным соотношением свинины и говядины (10,0 : 90,0 %; 1,0 : 99,0 %; 0,1 : 99,9 % и 0,01 : 99,99 %);

- из свинины: свежие (не более 2 ч с момента выработки), замороженные (при температуре минус 40 °С) и термообработанные (варка до достижения 70–72 °С в центре образца);

3) стерилизованные кусковые мясные консервы высшего сорта, выработанные по ГОСТ 32125-2013:

- из говядины (ООО «ПК МАМИР», состав: говядина, жир говяжий, лук репчатый, соль поваренная пищевая, лист лавровый)

- из свинины (ООО «Русская Ресурсная Компания – Сибирь», состав: свинина, лук репчатый, соль поваренная пищевая, лист лавровый, перец черный).

2.2. Организация эксперимента

Для реализации настоящей диссертационной работы, достижения цели и решения поставленных задач был составлен план проведения экспериментальных исследований, которые проводились в условиях Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Испытательном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (ИБМХ); лаборатории гигиены производства и микробиологии, отделе научно-прикладных и технологических разработок ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Исследования были проведены поэтапно согласно схеме исследования, представленной на рисунке 2.

Теоретический этап включал в себя анализ современных протеомных подходов, существующих вариаций двумерного электрофореза и выбор объектов исследования. В качестве начального этапа экспериментальных исследований был проведен подбор оптимальных условий проведения двумерного электрофореза для мышечной ткани. Далее были изучены мышечные ткани свиней различной локализации в разные периоды онтогенеза с помощью электрофоретических методов и с использованием ВЭЖХ системы, соединенной с масс-спектрометром и электрораспылительной ионизацией. Проведена оценка белкового состава при изучении фарша с заданным количеством сырья и изучено влияние после термического воздействия на протеомный состав фаршевых систем с использованием 2ДЭФ и биоинформационного анализа. А также проведена адаптация пробоподготовки двумерного электрофореза для мясных кусковых консервов.

Рисунок 2 – Схема организации исследования.

2.3. Методы исследований

В работе использовали стандартные и общепринятые химические, физико-химические, биохимические методы исследований, а также биоинформационный анализ результатов. Проводимая работа преимущественно основывалась на протеомных методах.

Одномерный электрофорез проводили в 12,5 %-ом полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в камере (Helicon, Россия) при постоянной силе тока и напряжении 55 В и 130 В в течение 2 ч. В качестве раствора стандартов использовали маркер, состоящий из белковых препаратов с молекулярной массой 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20 кДа (Thermo, Латвия). Последующее обнаружение белков проводили окрашиванием кумасси бриллиантовым синим G-250 (PanReac, Испания).

Двумерный электрофорез

Белки разделяли с использованием камеры (Bio-Rad, США) с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в стеклянных трубках в первом направлении (рисунок 3) и электрофорезом в пластине полиакриламидного геля размером (170×180 ×1,5) мм во втором направлении как описано [Matsumoto et. al., 2019] с небольшими доработками: ИЭФ в первом направлении выполнялся до достижения значения 3650 В×ч$^{-1}$ [Akhremko, 2020]. Окрашивание белковых фракций проводили с помощью раствора кумасси бриллиантового синего G-250 (PanReac, Испания).

Для компьютерной денситометрии использовали двумерные электрофореграммы во влажном состоянии. Их полные цифровые изображения и/или изображения отдельных фрагментов были получены с помощью сканера Bio-5000 plus (Serva, Германия) с разрешением 300 ppi. Отсканированные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ImageMaster ™ 2D Platinum на базе Melanie 8.0 (GE Healthcare and Genebio, Швейцария). Пятна выявлялись и количественно определялись автоматически с минимальными порогами: saliency – 11, min area – 5 и smooth – 3. Затем оцифрованные 2DE-изображения сравнивали методом сопоставления. Белковые пятна на двумерных электрофореграммах мышечной ткани интерпретировали в соответствии с базой данных Swiss-Prot

[O'Donovan et al., 2002] и базой данных протеомики мышечных органов [Kovaleva et al., 2013]. Более подробно биоинформационный анализ одно- и двумерных электрофореграмм приведен в Приложении 1.

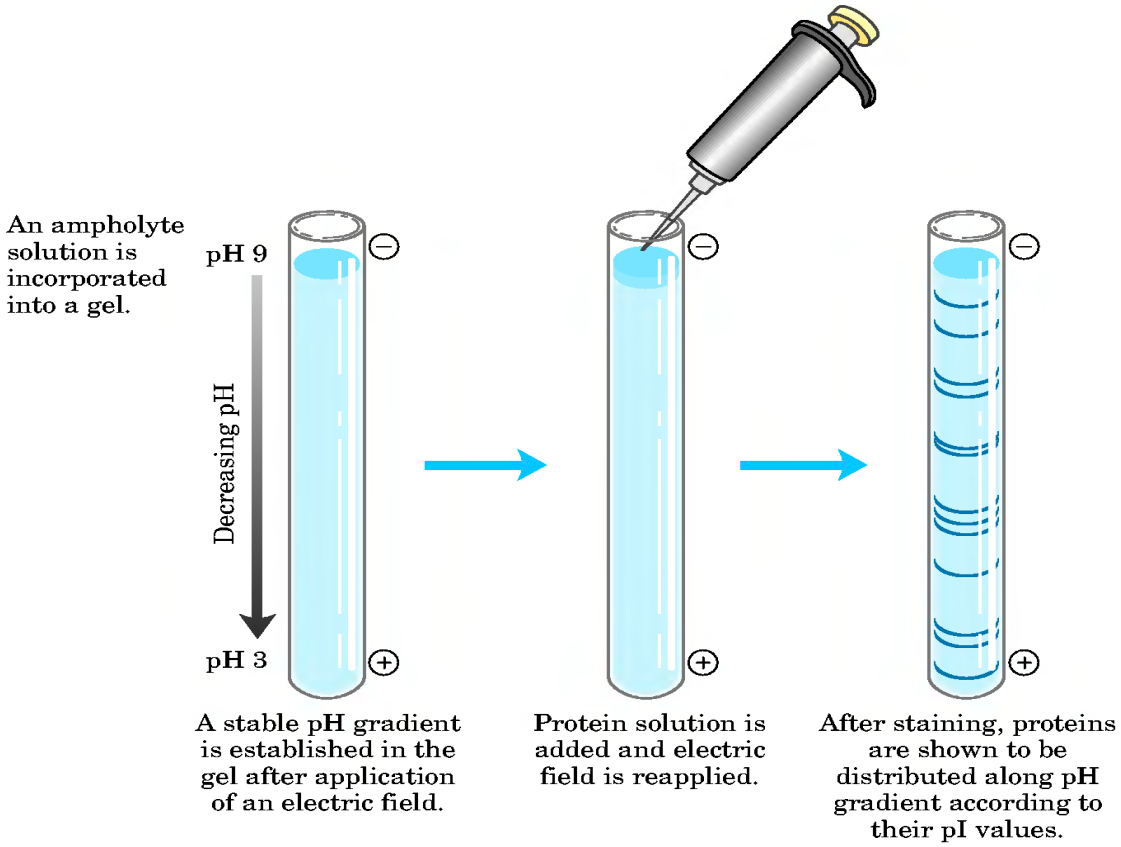


Рисунок 3 – Схема проведения первого направления 2ДЭФ.

Масс-спектрометрический анализ

Для **гидролиза белков** к образцам добавляли по 50 мкл 50 мМ ТЭАБ (pH 8,5) и по 10 мкл трипсина (Promega, США) с концентрацией 0,2 мг/мл. Смесь инкубировали в течение 12 часов при температуре 37 °C при встряхивании 350 об/мин. Реакцию останавливали раствором 0,7%-ой трифторуксусной кислоты с последующей экстракцией в 70%-ом ацетонитриле в 0,1%-ой муравьиной кислоте. Фильтрат высушивали в вакуумном концентраторе и растворяли в 5 мкл 0,1%-ой муравьиной кислоты для последующего масс-спектрометрического анализа.

Протеомный анализ пептидов осуществляли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, США) соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HFX (Thermo Scientific, США). Один микролитр пептидной смеси загружали на обогащающую колонку

Acclaim μ-Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом режиме с использованием буфера «С» в качестве подвижной фазы (2%-ый ацетонитрил, 0,1%-ая муравьиная кислота в деионизованной воде). Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке Acclaim Pepmap® C18 (75 мкм × 150 мм, 2 мкм размер частиц) (Thermo Scientific, США) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1%-ая муравьиная кислота) и подвижной фазой Б: (80%-ый ацетонитрил, 0,1%-ый водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2%-ой подвижной фазой Б в течение 10 мин. После этого линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 68 миню. Затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 2 мин. После двухминутной промывки при 99% буфера Б, концентрацию этого буфера линейно снижали до исходных 2% за 3 мин. Общая длительность анализа составляла 90 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX в режиме положительной ионизации с использование источника NESI (Thermo Scientific, США). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2,1 кВ, температура капилляра 240 °С. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 *m/z* до 1500 *m/z* при разрешении 120,000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 *m/z* до верхней границы, которая определяется автоматически, исходя из массы прекурсора, но не более 2000 *m/z*. Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ±1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как не более 40. При этом граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа бала установлена как 50000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от z=2+ до z=6+ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов –110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали 1×10^6 и

2×10^5 соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного МС/МС анализа на 90 с.

Идентификацию белков проводили при помощи программы MaxQuant Vol.1.6.3.4 с использованием поискового алгоритма Andromeda. Для идентификации белков использовали базу данных последовательностей Uniprot с ограничением по видовой принадлежности организма *Sus scrofa* (Pig).

Были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ±5 ppm, точность определения масс в спектрах МС/МС ±0,01 Да и возможность пропуска двух сайтов расщепления трипсином. Окисление метионинов, N-концевое ацетилирование белка и модификация цистеина пропионамидом были учтены как возможные модификации пептидов. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков использовали величину FDR (False Discovery Rate) не более 1,0 %. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида. Безметковая количественная оценка содержания белков происходила на основе эмпирических показателей iBAQ и LFQ.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Результаты подбора оптимальных условий для проведения двумерного электрофореза при изучении мясного сырья

Традиционно 2-ДЭ осуществляют фракционированием белков по двум различным физико-химическим параметрам. В первом направлении белки разделяют по заряду согласно их изоэлектрической точке путем ИЭФ, а затем во втором направлении согласно их молекулярной массе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Классическая вариация метода двумерного электрофореза не в полной мере позволяет выявить белки мышечной ткани. В связи с этим далее рассмотрены некоторые вариации проведения 2-ДЭ для определения оптимального варианта анализа мясного протеома на примере мышц *l. dorsi* свиньи. В работе применены две вариации изоэлектрофокусирования и два способа инкубации гелей после ИЭФ (рисунок 4).

Для проведения исследования был выбран способ ИЭФ в стеклянных трубках (“glass-tube”), несмотря на то что в большинстве современных научных работ при осуществлении двумерного электрофореза, ИЭФ проводят с использованием тонкого слоя геля, нанесенного на пластиковую подложку (то есть IPG Dry Strip), что значительно упрощает работу [Naveena et. al., 2017]. Это обусловлено тем, что “glass-tube” ИЭФ, несмотря на трудоемкость процесса, имеет преимущество в разрешающей способности и объеме загрузки количества белка в гель [Matsumoto et. al., 2019].

В первом классическом варианте ИЭФ катодный буфер (0,02 М гидроксид натрия) находился сверху, а анодный буфер (0,01 М ортофосфорная кислота) – снизу. Во второй вариации ИЭФ было изменено направление тока, то есть анодный буфер находился сверху, а катодный буфер снизу.

После проведения ИЭФ гели инкубировали двумя разными способами: первый заключался в последовательном инкубировании трубчатого геля в течение 10 мин в 2,5 мл выравнивающего буфера I (6 М мочевина, 20% $_{мас. / об.}$ глицерина, 2 % $_{мас. / об.}$ SDS и 1 % $_{мас. / об.}$ DTT в 375 мМ Трис-HCl буфере, pH 8,8), а затем 10 мин в буфере для уравновешивания II (6 М мочевина, 20 % $_{масс./об.}$ глицерина, 2 % $_{масс./об.}$

SDS и 4 %$_{масс./об.}$ йодацетамида в 375 мМ трис-HCl буфере, pH 8,8); второй – в инкубировании в течение 10 – 15 мин в 2,5 мл буфера А (5 М мочевина, 2 % $_{масс./об.}$ SDS, 5% $_{об./об.}$ меркаптоэтанол, 62,5 мМ Tris-HCl буфер, pH 6,8, 0,01% $_{мас. / об}$ бромфенолового синего).

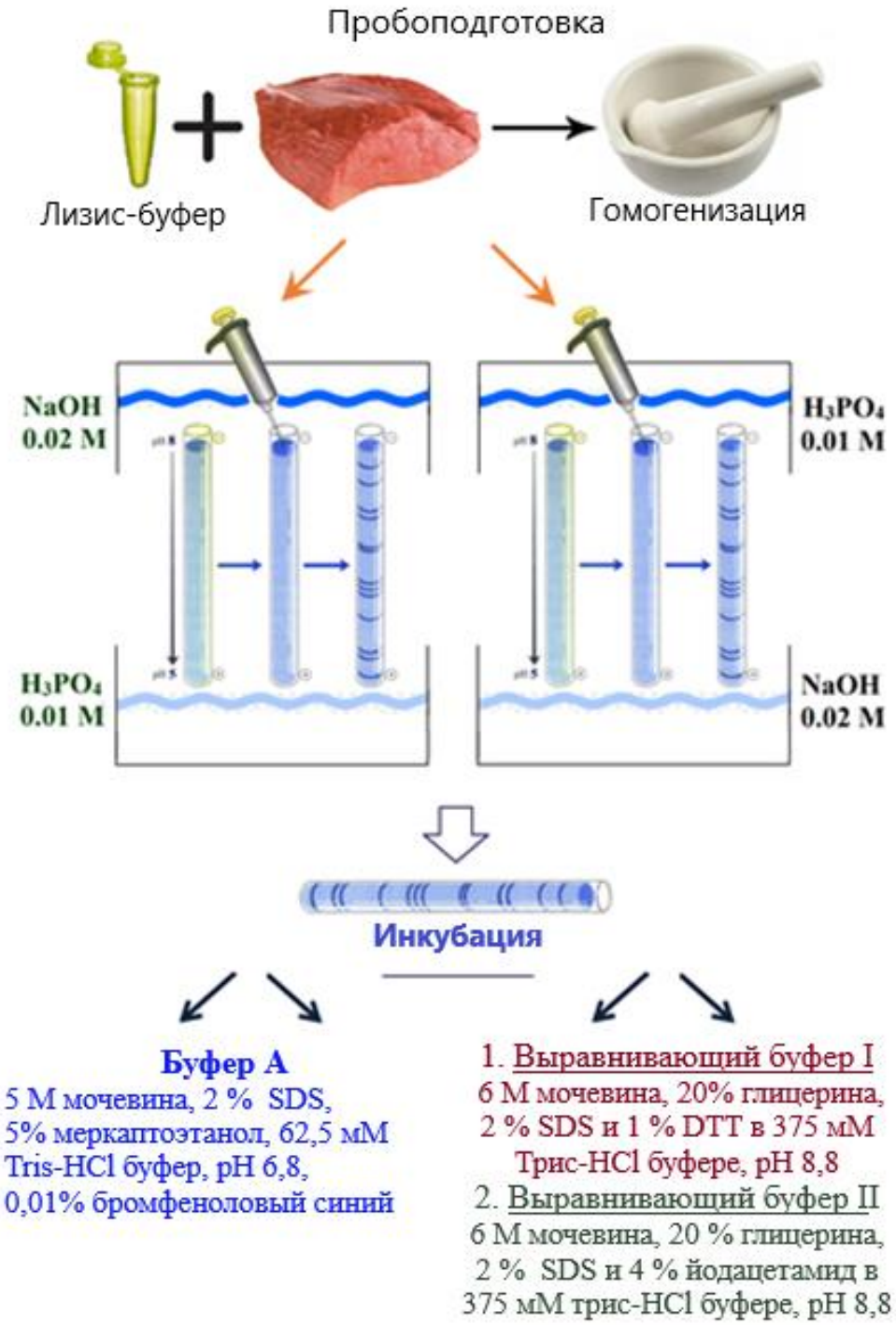


Рисунок 4 – Схема проведения 2-ДЭ для определения оптимального варианта анализа мясного протеома на примере мышц *l. dorsi* свиньи.

Для SDS-PAGE уравновешенные гели переносили в 12,5% ПААГ. Электрофорез проводили в рабочем буфере геля, содержащем 25 мМ Трис-HCl, 192 мМ глицина и 0,1% SDS при 30 мА на гель до тех пор, пока фронт бромфенолового синего не достигал дна геля.

Полученные электрофореграммы четырех вариаций 2-ДЭ, проведенных в соответствии со схемой (рисунок 4), представлены на рисунке 5. Установлено различное распределение белков *L. dorsi* свиньи по молекулярным массам и изоэлектрическим точкам. При классическом варианте ИЭФ, когда 0,02 М NaOH находится сверху камеры, наблюдалось хорошее разделение белков с pI от 5 до 6,5 (рисунок 5, A). Среди которых можно отметить β-цепь тропомиозина (33,5 кДа, pI 4,80), α-3-цепь тропомиозина (33,5 кДа, pI 4,71), легкая цепь миозина-3 (22,0 кДа, pI 5,24) и легкая цепь миозина-1/3 (21,0 кДа, pI 5,80). Важным аспектом является то, что на 2-ДЭ с инкубированием в буфере A (рисунок 5 B) данные белки наиболее четко выявлялись.

Совершенно иная картина была получена при смене направления тока во время ИЭФ, то есть 0,01 М H_3PO_4 был сверху камеры. Получены четкие и хорошо выявленные белковые пятна с равномерным распределением по всей площади геля (рисунок 5 C и D). Предположительно данный результат обусловлен тем, что белки мышечной ткани в большей мере представлены в кислой и нейтральной зоне геля, соответственно положительно заряженных белков большее количество. Так как ток всегда идет от «плюса» к «минусу», при смене направления течения тока положительно заряженным белкам, которые вводятся сверху, проще двигаться к низу электрофоретической ячейки, где создан отрицательный заряд (катод).

Интересно то, что при инкубации в выравнивающем буфере I и II (рисунок 5 C) лучше визуализируются белковые пятна с молекулярной массой более 50 кДа. При инкубировании в буфере A (рисунок 5 D) наоборот лучше визуализируются белковые пятна с молекулярной массой меньше 40 кДа.

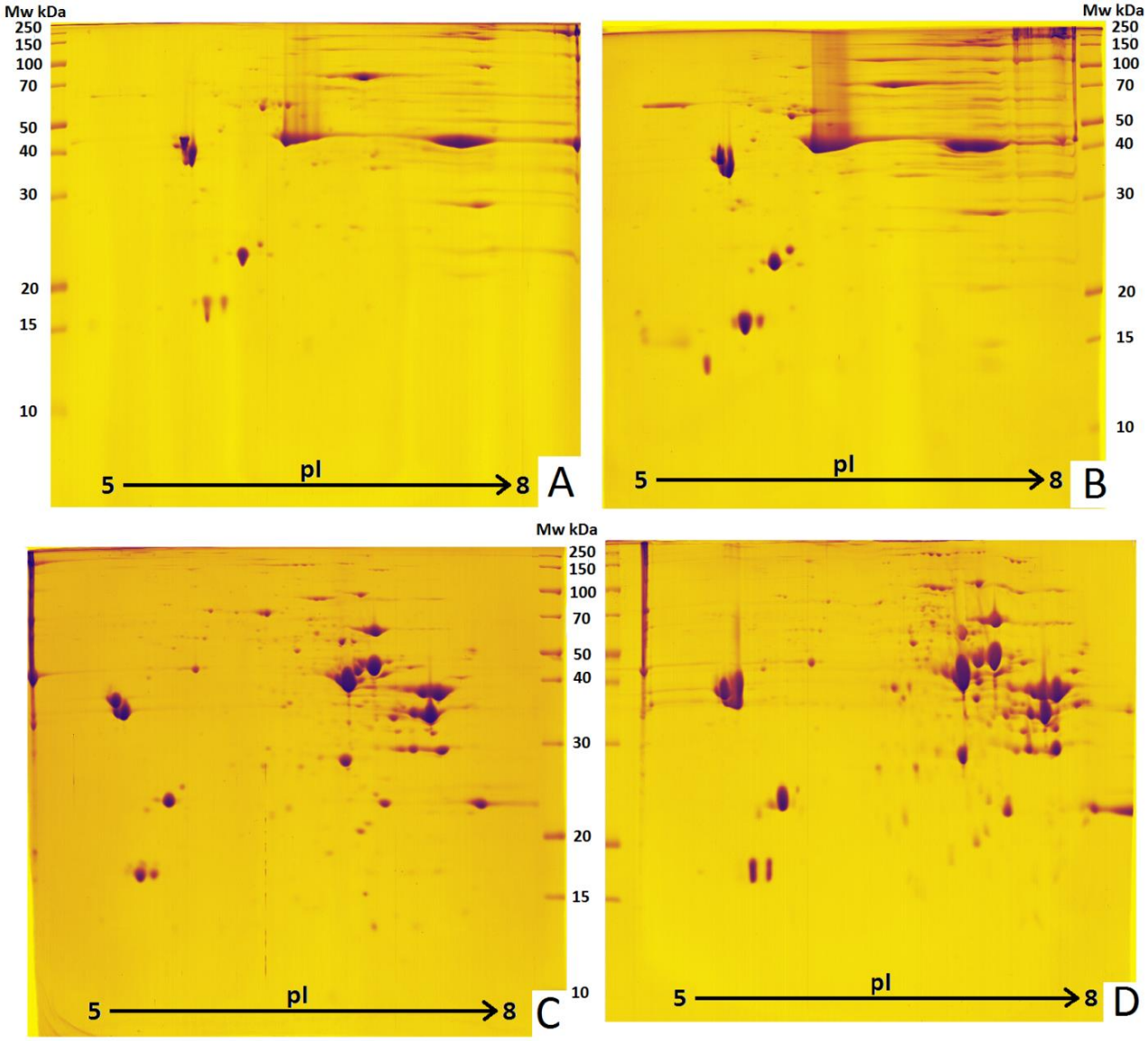


Рисунок 5 – 2-ДЭ *l. dorsi* свиньи. Условные обозначения: А - 0,02 М NaOH сверху, 0,01 М H_3PO_4 снизу, ИЭФ-гели инкубировали в выравнивающем буфере I и II; Б - 0,02 М NaOH сверху, 0,01 М H_3PO_4 снизу, ИЭФ-гели инкубировали в буфере А; С - 0,01 М H_3PO_4 сверху, 0,02 М NaOH снизу, ИЭФ-гели инкубировали в выравнивающем буфере I и II; D - 0,01 М H_3PO_4 сверху, 0,02 М NaOH снизу, ИЭФ-гели инкубировали в буфере А.

Также был проведен денситометрический анализ четырех полученных электрофореграмм для определения основных структурных белков *l. dorsi* свиньи. В рамках работы пятна были сопоставлены по объему и рассчитан показатель Fold, превышение которого более чем на 2 единицы общепринято считается статистически значимым отличием. Данный показатель в конкретном случае является соотношением между белковыми пятнами четырех 2-ДЭ с самым высоким

средним значением и с самым низким средним значением. На рисунке 6 отмечены основные фракции структурных белков *l. dorsi* свиньи.

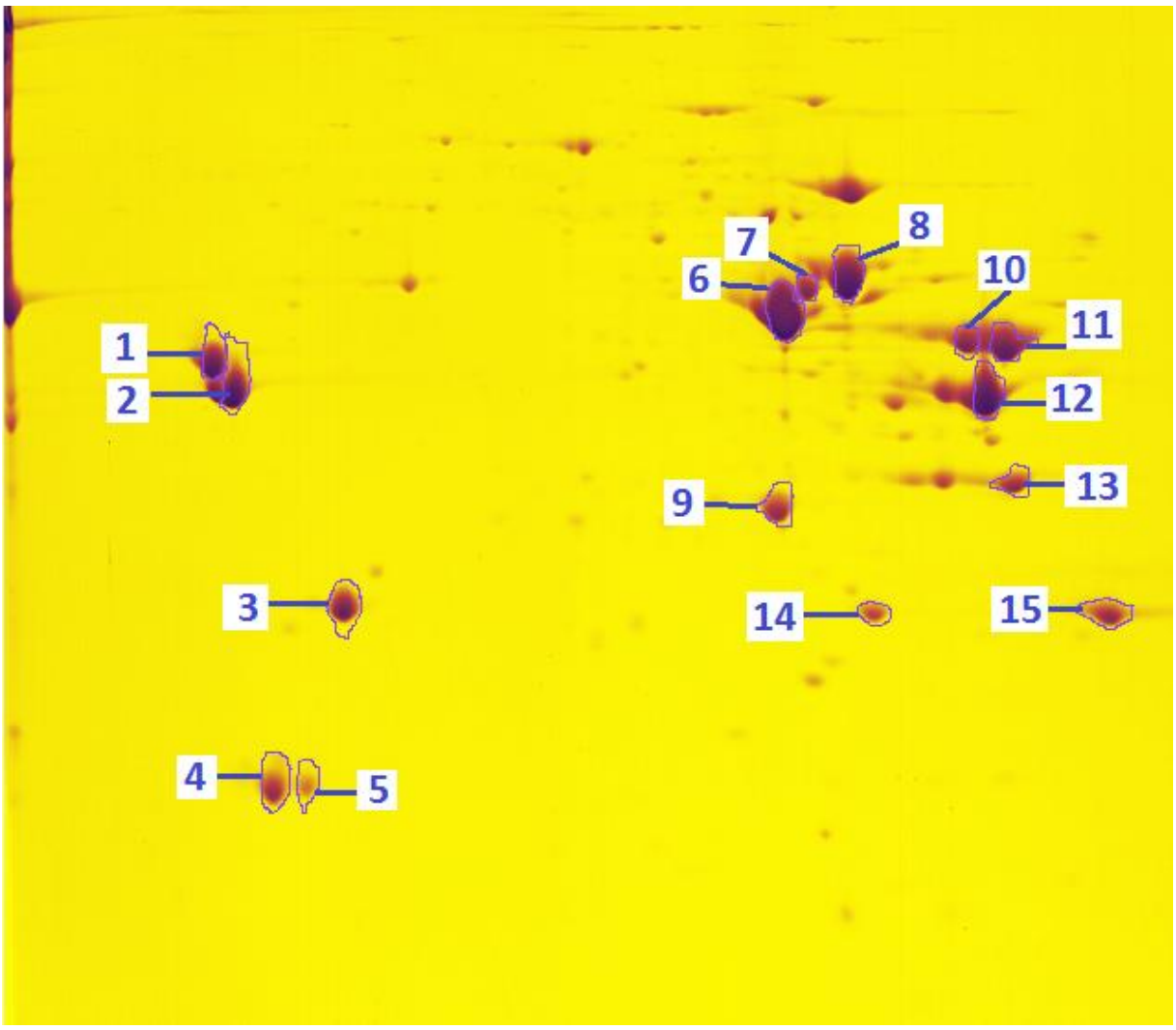


Рисунок 6 – Совмещенные 2-DE *l. dorsi* свиньи с обозначением структурных мышечных белков для денситометрической оценки.

В результате денситометрического анализа было выявлено восемь фракций с показателем Fold>2 (отмечены * в таблице 1). Соответственно у данной группы белков наблюдалось увеличение объёма пятна, по меньшей мере, в два раза по отношению к классическому варианту ИЭФ.

В процессе выполнения данного исследования показано, что вариация ИЭФ, когда в верхней ячейке камеры находится гидроксид натрия, обладает более низкой разрешающей способностью и не выявляет должным образом белковые фракции в щелочной зоне геля. В правой половине электрофореграммы белки не

сфокусированы. В данном случае, чтобы добиться лучшего разделения белков, необходимо увеличить количество Вольт-часов, как минимум, на 40 %.

Таблица 1 – Результаты денситометрического анализа белковых фракций *l. dorsi* свиньи (vol ± SD).

№ белкового пятна	Обозначение электрофореграмм			
	A×10^7	**B×10^7**	**C×10^7**	**D×10^7**
1	8,19 ±1,16	5,75 ±0,90	7,47 ±0,06	7,34 ±0,10
2	10,18 ±0,26	10,70 ±0,14	11,48 ±0,26	12,00 ±0,34
3	9,37 ±0,20	8,97 ±0,44	8,58 ±0,53	9,64 ±0,63
4	4,39 ±0,25	9,47 ±1,05	7,51 ±0,15	7,20 ±0,23
5	1,92 ±0,39	2,71 ±0,72	2,95 ±0,54	4,03 ±0,66
6	10,65 ±0.62	9,42 ±0,84	14,42 ±0,60	13,23 ±0,98
7	8,19 ±0,41	5,75 ±1,22	7,47 ±0,07	7,34 ±0,64
8*	0,64 ±0,16	1,04 ±0,88	13,30 ±0,50	11,82 ±0,97
9*	0,34 ±0,05	0,42 ±0,14	6,35 ±0,60	6,23 ±0,74
10*	2,42 ±0,61	1,26 ±0,58	5,84 ±0,64	4,63 ±0,43
11*	1,24 ±0,02	1,57 ±0,27	10,68 ±0,74	9,68 ±0,85
12*	0,40 ±0,25	0,89 ±0,31	13,37 ±1,20	10,78 ±0,92
13*	0,29 ±0,08	0,45 ±0,11	4,91 ±0,27	5,45 ±0,59
14*	0,24 ±0,04	0,13 ±0,02	3,16 ±0,54	3,19 ±0,71
15*	4,23 ±0,25	0,24 ±0,08	5,61 ±0,44	2,47 ±0,37

Такие меры потребуют больше времени на выполнение анализа на несколько часов. В случае смены направления движения электрического тока процесс проходит за 4 ч и выявляется, по меньшей мере, в два раза больше белковых пятен, в том числе основных структурных мышечных белков, таких как глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, группы тропонинов, гидроксиацил-3-коэнзим А дегидрогеназа, бета-енолаза и др.

Таким образом, результаты электрофоретических исследований показали, что наиболее информативным вариантом для разделения белков мышечной ткани является изменение направления тока, а именно анодный вариант. Также допустимо использование инкубации как в буфере А, так и в выравнивающих

буферах. Денситометрический анализ гелей показал, что при таком варианте выявляется большее количество белков и интенсивность определенных фракций увеличивается, как минимум, в два раза. Данную вариацию можно рассматривать как основную при электрофоретическом анализе мышечных белков, поскольку она требует меньше времени и обладает более высокой разрешающей способностью.

3.2. Результаты изучения протеомного профиля образцов мышечной ткани разной локализации свиней в разные периоды онтогенеза

Было проведено исследование трех различных мышц *l. dorsi*, *b. femoris* и *m. brachiocephalicus* поросят-отъемышей методом двумерного электрофореза с целью выявления достоверных различий в белковом составе. Двумерные электрофореграммы представлены в Приложении 2. Фрагменты двумерных электрофореграмм, на которых отображены 18 фракций с показателем Fold> 2, представлены на рисунке 7 и в таблице 2.

Биоинформационный анализ выявленных белковых пятен позволяет предположить, что фракции, обозначенные цифрами 1 и 2 на рисунке 7, соответствуют миозиновым легким цепям быстрых (MLC1f) и медленных (MLC1s/v) скелетных мышц. Данные фракции достаточно хорошо проявлялись в *l. dorsi*. Интересно отметить, что в образцах *b. femoris* детектировалась только медленная цепь, а в *m. brachiocephalicus* – слабовыраженная фракция MLC1s/v Montowska и Pospiech [2012] в своих исследованиях использовали MLC в качестве маркера для аутентификации мясных продуктов, изготовленных из свинины и других видов мяса.

Группа белков в диапазоне молекулярных масс от 50 до 60 кДа, отмеченных номерами 3–7 на рисунке 7, более явно выражена в мышцах *b. femoris*, слабее выявлена в *l. dorsi*, в *m. brachiocephalicus* наблюдалась в следовых количествах.

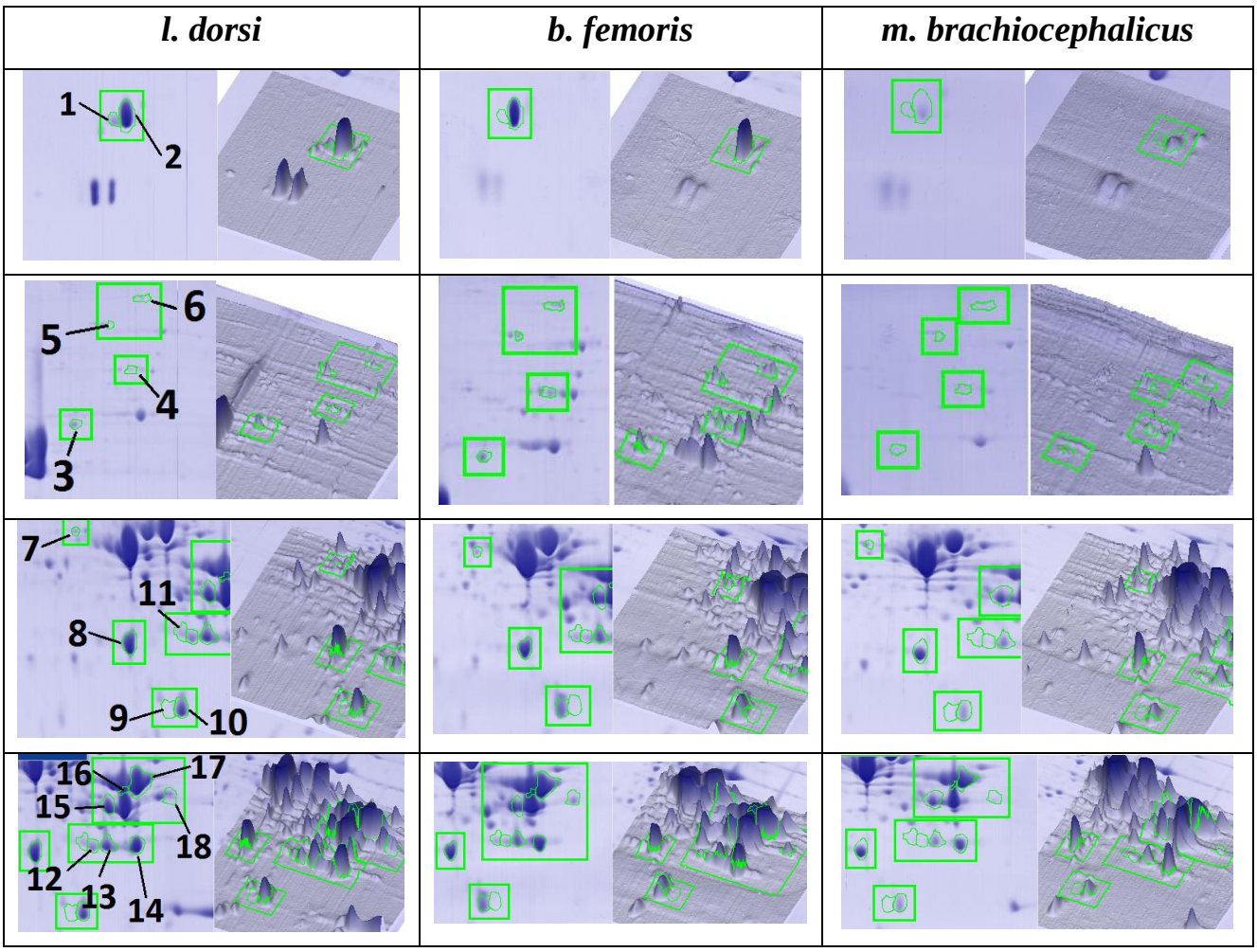


Рисунок 7 – Фрагменты 2-DE гелей мышечной ткани поросят-отъемышей.

Интенсивность окрашивания белка № 8 (рисунок 7) равномерно снижалась от *l. dorsi* до *m. brachiocephalicus*. Такая же тенденция наблюдалась у фракций № 13 – № 17, среди которых, предположительно, присутствуют фракции тропонинов. Белок скелетных мышц тропонин I уже охарактеризован как потенциальный термостабильный и видоспецифичный биомаркер мышечной ткани млекопитающих в сыром мясе и мясных продуктах [Zvereva et. al., 2015], что делает его перспективным в выявлении мышц разной локализации. Возможно, более низкое значение объёма пятна в *m. brachiocephalicus* связано с биологической функцией данной мышцы, так как она менее активна по сравнению с *l. dorsi* и *b. femoris*. Интересное распределение белковых пятен отмечено у фракций № 9 и № 10. Так в *b. femoris* обнаруживался только белок № 9, но в небольшом количестве присутствовала фракция № 10 (аденилаткиназа). При этом в длиннейшей мышце спины его интенсивность больше, чем в *m. brachiocephalicus*. Объём пятна № 11 у

m. brachiocephalicus был в три раза меньше, чем у *l. dorsi* и *b. femoris*. Самое большое значение показателя Fold отмечено у фракции № 12, вероятно являющейся фосфоглицеральмутазой, и соответствует значению 10,5; также максимально выражен в *l. dorsi*. белок № 18 более сильно выражен в *b. femoris*, менее интенсивно отмечен в *l. dorsi* и в небольшом количестве в *m. brachiocephalicus* [Akhremko et. al., 2021].

Описанные выше изменения в интенсивности окрашивания выбранных белковых фракций могут отражать интенсивность процессов роста мышечной ткани у растущих животных. Например, для *l. dorsi*, наиболее мощной мышцы позвоночного столба, обуславливающей движение туловища и головы, выявлено максимальное количество интенсивно окрашенных белковых фракций. Кандидатными маркерами для *l. dorsi* свиньи могут выступать фракции 1, 3, 8, 10–17 (рисунок 7, таблица 2). Для мышцы *b. femoris*, функционально активной: разгибающей тазобедренный и скакательный суставы и сгибающей коленный сустав, маркерами могут служить мышечные фракции 2, 4–7, 9 и 18 (рисунок 7, таблица 2). Мышца бедра и ее белковый профиль достаточно хорошо изучены, так как из свиного окорока изготавливается различные варианты вяленой ветчины (хамон, пршут, прошутто). Уже известно, что пептиды, образующиеся в данной мышце, обладают биологической функциональностью (некоторые пептиды из белков MLC1, CK, MYO, TNT и MHC7 оказались наиболее влиятельными).

Таблица 2 – Результаты денситометрического анализа белковых фракций мышечной ткани свиньи (vol ±SD).

№ Белкового пятна	*l. dorsi*	*b. femoris*	*m. brachiocephalicus*
1	$9{,}07 \pm 1{,}19 \times 10^6$	$2{,}60 \pm 1{,}63 \times 10^6$	$1{,}46 \pm 0{,}36 \times 10^6$
2	$0{,}11 \pm 1{,}35 \times 10^7$	$8{,}93 \pm 1{,}13 \times 10^7$	$2{,}78 \pm 1{,}77 \times 10^7$
3	$3{,}84 \pm 0{,}67 \times 10^6$	$2{,}74 \pm 1{,}15 \times 10^6$	$1{,}02 \pm 0{,}37 \times 10^6$
4	$1{,}15 \pm 0{,}34 \times 10^6$	$2{,}63 \pm 0{,}52 \times 10^6$	$1{,}18 \pm 0{,}57 \times 10^6$
5	$2{,}55 \pm 0{,}63 \times 10^5$	$1{,}18 \pm 0{,}29 \times 10^6$	$2{,}72 \pm 0{,}67 \times 10^5$
6	$6{,}88 \pm 3{,}57 \times 10^5$	$2{,}42 \pm 0{,}40 \times 10^6$	$1{,}42 \pm 0{,}47 \times 10^6$
7	$1{,}49 \pm 0{,}79 \times 10^6$	$5{,}96 \pm 1{,}67 \times 10^6$	$3{,}49 \pm 0{,}22 \times 10^6$
8	$6{,}21 \pm 0{,}29 \times 10^7$	$5{,}16 \pm 0{,}83 \times 10^7$	$1{,}75 \pm 1{,}52 \times 10^7$
9	$4{,}90 \pm 2{,}28 \times 10^6$	$1{,}86 \pm 1{,}21 \times 10^7$	$2{,}08 \pm 0{,}16 \times 10^6$
10	$3{,}33 \pm 0{,}48 \times 10^7$	$1{,}27 \pm 0{,}92 \times 10^7$	$8{,}07 \pm 5{,}80 \times 10^6$
11	$5{,}93 \pm 1{,}10 \times 10^6$	$5{,}78 \pm 1{,}72 \times 10^6$	$2{,}03 \pm 0{,}49 \times 10^6$
12	$1{,}77 \pm 0{,}45 \times 10^7$	$8{,}42 \pm 2{,}46 \times 10^6$	$1{,}69 \pm 0{,}54 \times 10^6$
13	$4{,}37 \pm 0{,}32 \times 10^7$	$3{,}38 \pm 1{,}30 \times 10^7$	$1{,}24 \pm 0{,}34 \times 10^7$
14	$5{,}99 \pm 0{,}19 \times 10^7$	$5{,}19 \pm 1{,}02 \times 10^7$	$1{,}84 \pm 1{,}53 \times 10^7$
15	$5{,}31 \pm 0{,}88 \times 10^7$	$4{,}18 \pm 0{,}62 \times 10^7$	$2{,}52 \pm 0{,}99 \times 10^7$
16	$1{,}56 \pm 0{,}28 \times 10^7$	$7{,}86 \pm 2{,}20 \times 10^6$	$3{,}90 \pm 2{,}56 \times 10^6$
17	$1{,}40 \pm 0{,}12 \times 10^8$	$1{,}16 \pm 0{,}05 \times 10^8$	$6{,}86 \pm 1{,}51 \times 10^7$
18	$1{,}07 \pm 0{,}23 \times 10^7$	$1{,}21 \pm 0{,}17 \times 10^7$	$3{,}71 \pm 1{,}17 \times 10^6$

Примечание. Объем пятна (Vol) был нормализован по общему действительному объему пятна и среднему значению для дублированных гелей в трех повторностях. Представленные данные являются средним значением ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.
* Объем пятна — это сумма значений серого за вычетом фона всех пикселей, ограниченных пятном.

Таким образом, в составе мышцы *l. dorsi* выявлено 11 белков, а в *m. brachiocephalicus* – 7. Кроме того в последней отмечена тенденция более низкой интенсивности белковых фракций, часть из которых меньше на порядок в сравнении с *l. dorsi.* Наименьшая интенсивность окрашивания белковых фракций отмечена в тканях *m. brachiocephalicus*, что возможно связано с низкими метаболическими процессами в данной мышце, обусловленными низкой функциональной нагрузкой.

При электрофоретическом исследовании мышечной ткани **половозрелых свиней** различной локализации (рисунок 8, таблица 3) различия по большей мере

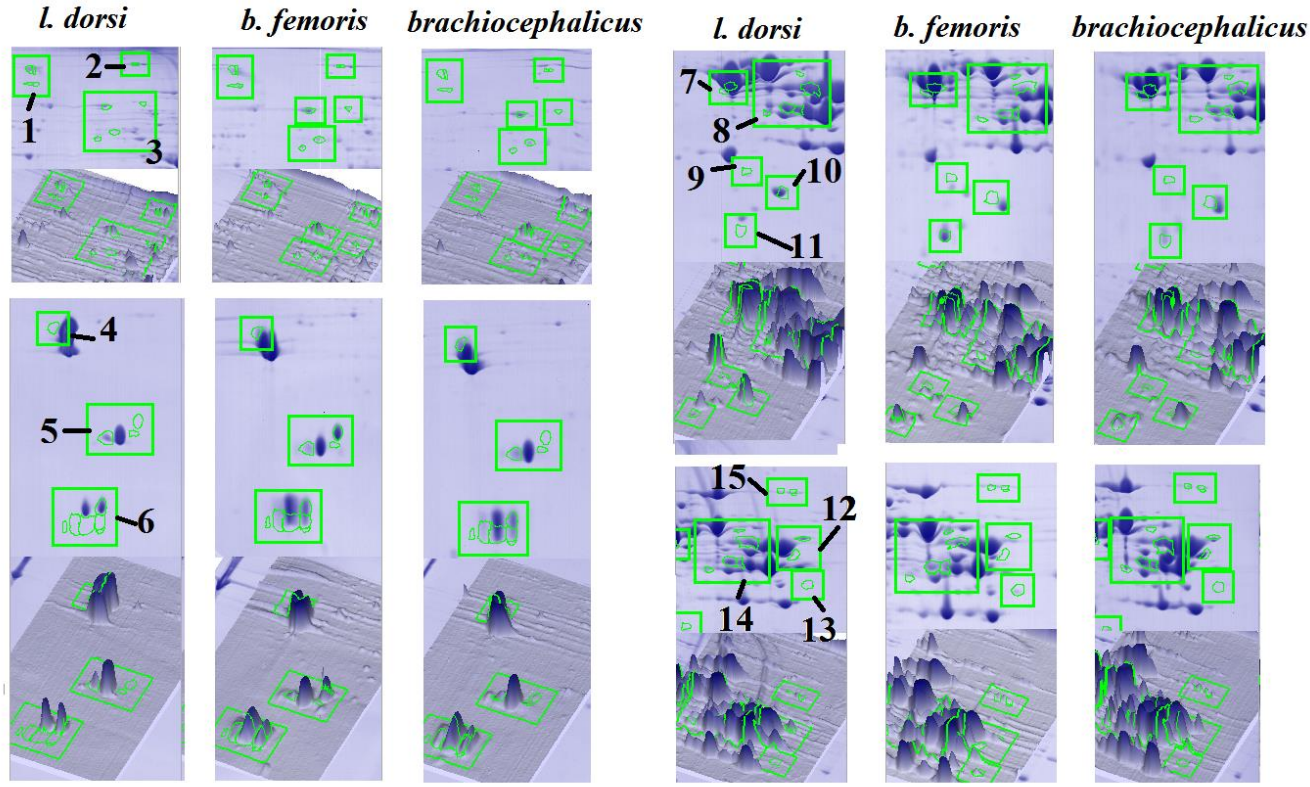


Рисунок 8 – Фрагменты 2-DE гелей мышечной ткани половозрелых свиней.

обнаружены в минорных белковых фракциях. Группа белков (№ 1–3, рисунок 8) в области более 70 кДа, такие как альфа-1,4-глюканфосфорилаза, аминоксидаза,

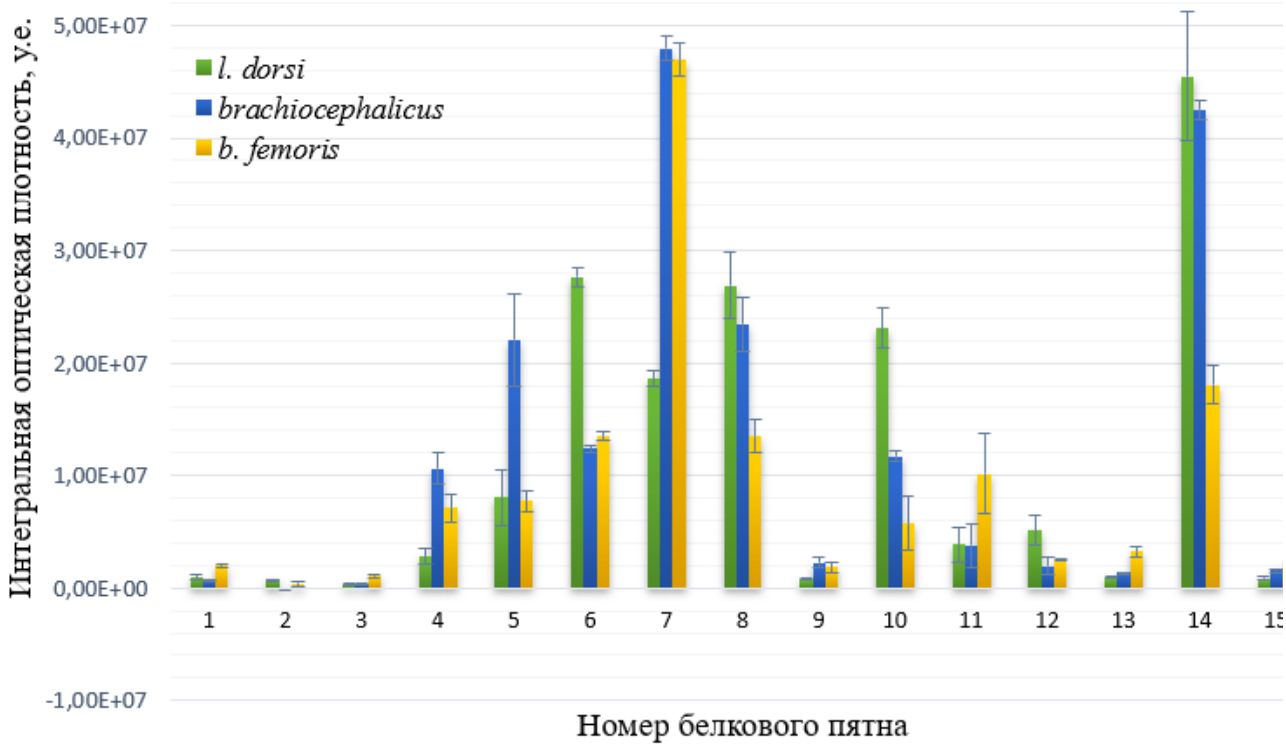


Рисунок 9 – Профиль экспрессии белковых фракций мышечной ткани половозрелых свиней.

актин-деполимеризующий фактор и белок теплового шока HSP 90-альфа в значительно большем количестве (рисунок 9, Fold>3,05) обнаруживалась в *m. brachiocephalicus*. Также, отмечено преобладание в тканях *m. brachiocephalicus* белков CFL2b вариант 1 и тропонинов С быстрых и медленных скелетных мышц, отвечающих за связывание актиновых филаментов.

Среди структурных мышечных белков значимые отличия выявлены во фрагментах тропомиозина, миозиновых легких цепей 1 и αβ-кристаллина (№ 4, № 5, № 11 на рисунке 8), которые, как минимум, в два раза интенсивнее были выражены в тканях *b. femoris*. Для *l. dorsi* определяющими фракциями стали № 6, № 10 и № 12, являющиеся миозиновыми легкими цепями 2, ациредуктон-диоксигеназа и гамма-актином-2 в соответствии с масс-спектрометрической

Таблица 3 – Результаты денситометрического анализа белковых фракций мышечной ткани половозрелых свиней (vol ±SD)

№ пятна	*l. dorsi*	*b. femoris*	*m. brachiocephalicus*	Fold
1	$9{,}03 \pm 0{,}24 \times 10^5$	$6{,}54 \pm 0{,}10 \times 10^5$	$2{,}00 \pm 0{,}11 \times 10^6$	3,05
2	$7{,}29 \pm 0{,}27 \times 10^5$	$0{,}97 \pm 0{,}06 \times 10^5$	$3{,}65 \pm 0{,}18 \times 10^5$	7,45
3	$3{,}95 \pm 0{,}42 \times 10^5$	$3{,}20 \pm 0{,}22 \times 10^5$	$1{,}10 \pm 0{,}17 \times 10^6$	3,43
4	$2{,}78 \pm 0{,}69 \times 10^6$	$1{,}06 \pm 0{,}14 \times 10^7$	$7{,}11 \pm 1{,}28 \times 10^6$	3,82
5	$8{,}03 \pm 2{,}50 \times 10^6$	$2{,}20 \pm 0{,}41 \times 10^7$	$7{,}73 \pm 0{,}91 \times 10^6$	2,85
6	$2{,}76 \pm 0{,}09 \times 10^7$	$1{,}24 \pm 0{,}02 \times 10^7$	$1{,}35 \pm 0{,}42 \times 10^7$	2,23
7	$1{,}86 \pm 0{,}07 \times 10^7$	$4{,}80 \pm 0{,}11 \times 10^7$	$4{,}70 \pm 0{,}15 \times 10^7$	2,58
8	$2{,}69 \pm 0{,}29 \times 10^7$	$2{,}35 \pm 0{,}23 \times 10^7$	$1{,}35 \pm 0{,}15 \times 10^7$	2,13
9	$8{,}32 \pm 0{,}86 \times 10^5$	$2{,}24 \pm 0{,}46 \times 10^6$	$1{,}86 \pm 0{,}46 \times 10^6$	2,68
10	$2{,}31 \pm 0{,}18 \times 10^7$	$1{,}17 \pm 0{,}05 \times 10^7$	$5{,}76 \pm 2{,}44 \times 10^6$	4,01
11	$3{,}84 \pm 1{,}57 \times 10^6$	$1{,}02 \pm 0{,}70 \times 10^7$	$3{,}75 \pm 1{,}38 \times 10^6$	2,70
12	$5{,}13 \pm 1{,}25 \times 10^6$	$1{,}93 \pm 0{,}81 \times 10^6$	$2{,}53 \pm 0{,}12 \times 10^6$	2,66
13	$1{,}03 \pm 0{,}06 \times 10^6$	$1{,}36 \pm 0{,}01 \times 10^6$	$3{,}22 \pm 0{,}51 \times 10^6$	3,13
14	$4{,}55 \pm 0{,}57 \times 10^7$	$4{,}25 \pm 0{,}06 \times 10^7$	$1{,}80 \pm 0{,}17 \times 10^7$	2,52
15	$8{,}50 \pm 0{,}16 \times 10^5$	$1{,}57 \pm 0{,}16 \times 10^6$	$1{,}87 \pm 0{,}25 \times 10^6$	2,20

идентификацией. Интересно отметить, что креатинкиназа (субъединица М) и длинноцепочечная 3-кетоацил-КоА-тиолаза выявлялись в минимальных

количествах по сравнению с *b. femoris* и *m. brachiocephalicus*. При этом L-лактат дегидрогеназа А цепь и порин менее интенсивно отмечены в *b. femoris*.

Масс-спектрометрический анализ вырезанных полос с выраженными отличиями из одномерной электрофореграммы (рисунок 10) выявил 214 белков (Приложение 3), в больше степени, задействованные в клеточных и метаболических процессах, двигательной активности и локализации.

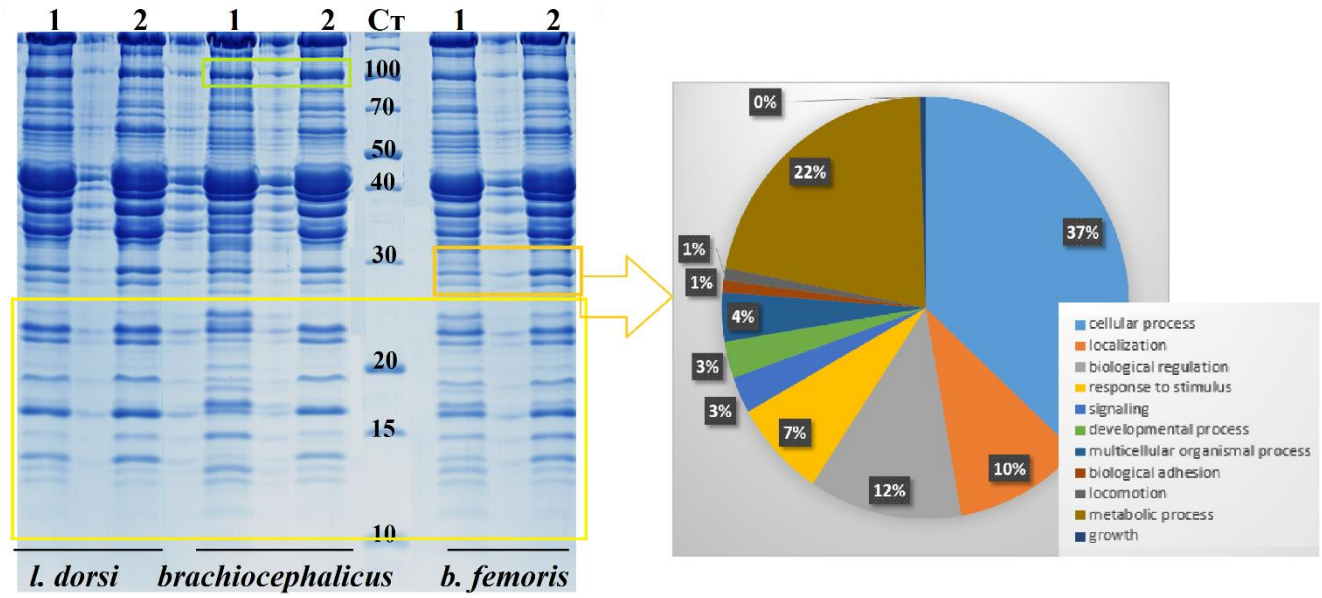


Рисунок 10 – Одномерная электрофореграмма мышц свиней в процессе роста (1 – поросята, 2 – половозрелые свиньи).

Биоинформационный анализ выявил, что 34 белка посттрансляционно модифицирована за счет образования амидной связи между аминогруппой и карбоксильной группой; образования связи между тиоловыми группами двух остатков пептидил-цистеина; фосфорилирования; ацетилирования; убиквитинирования и азотирования. В мышечной ткани *L. dorsi* был идентифицирован белок роста и развития посредством связывания рецептора семафорина и хеморепеллентной активности – семафорин-6Б (96,78 кДа). Также выявлены белки развития в *l. dorsi* и *b. femoris* кадгерин-13 (78,23 кДа), который посттрансляционно модифицируется путем расщепления по крайней мере одной пары основных остатков, чтобы высвободить один или несколько активных пептидов (таких как гормоны), кадгерин-7 (87,01 кДа), F-актин-кэпирующая

белковая субъединица бета (30,66 кДа) и два неохарактеризованных белка в 65,60 кДа и 63,88 кДа.

3.3. Результаты протеомных исследований фаршевых систем

3.3.1. Исследование белкового состава модельных фаршей с заданным количеством сырья электрофоретическим методом

На данной стадии работы была изучена возможность применения метода двумерного электрофореза для оценки состава мясных продуктов на примере модельных фаршей с заданным количеством сырья.

В качестве начального этапа исследования изучали модельные фарши с минимальным содержанием говядины (соотношение свинина : говядина (0,01 : 99,99) %) методом двумерного электрофореза. В результате были выбраны общие конститутивные фракции для всех модельных систем, которые представлены на рисунке 11. Подобные исследования уже проводились другими учеными [Ковалева и др., 2012], но при более равном соотношении количества сырья (55 % : 45 %; 60 % : 40 %; 70 % : 30 %). В связи с этим были выбраны более чувствительные пороги определения.

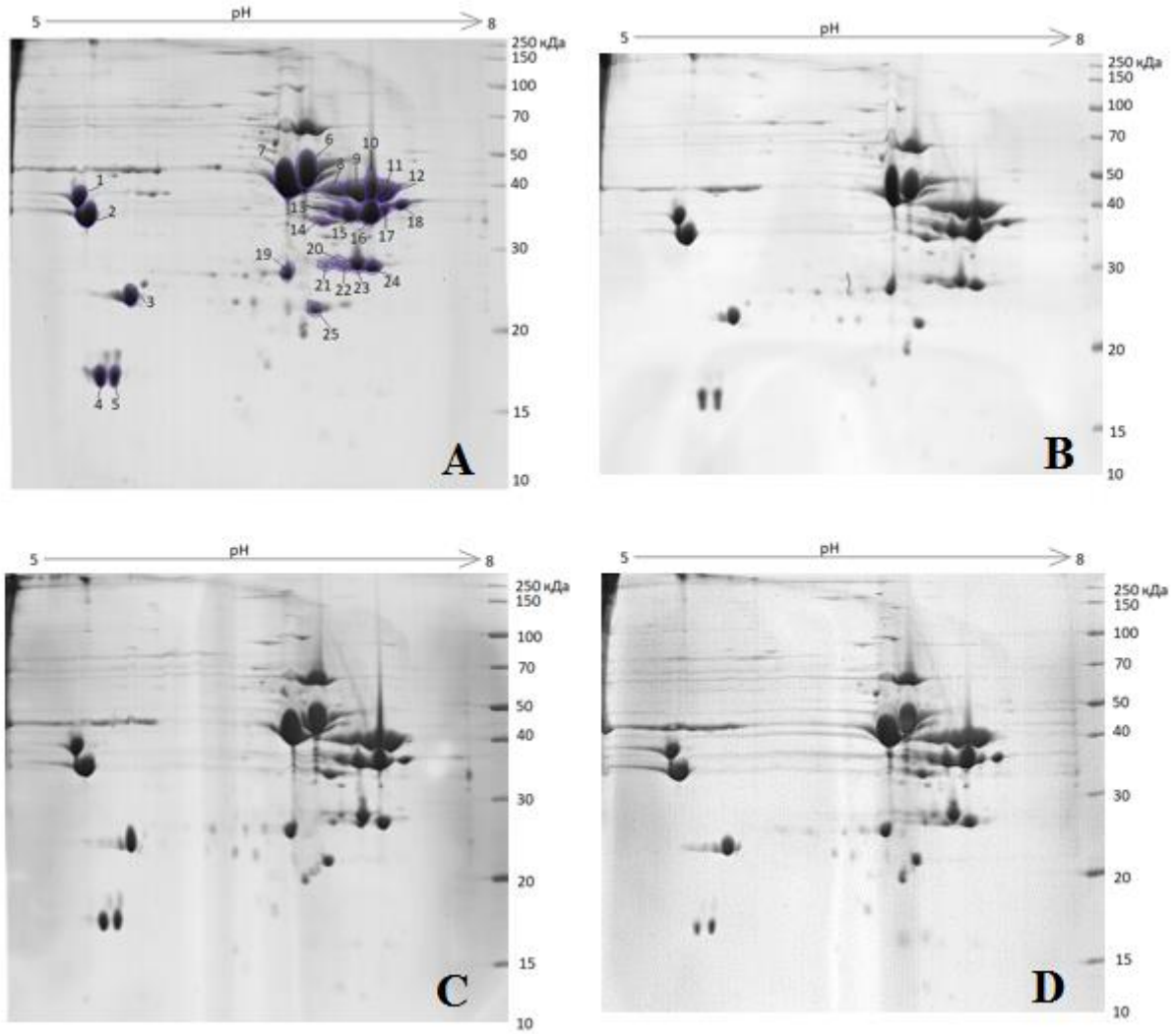


Рисунок 11 – Двумерная электрофореграмма модельных фаршей с различным содержанием говядины. Условные обозначения модельных фаршей из свиньи с добавлением говядины – длиннейшая мышца - с процентным соотношением: A - 0,01 : 99,99 %; B - 0,1 : 99,9 %; C - 1,0 : 99,0 %; D - 10,0 : 90,0 %.

При помощи ImageMaster™ 2D Platinum software изучены 2-DE гелевые изображения, и было выявлено порядка 150 пятен, присутствующих в каждом геле всех фаршевых систем. При этом наиболее выраженная интенсивность окрашивания белков выявлялась у образцов с 0,01 % содержанием говядины (рисунок 11 A). Наименее выраженная интенсивность окрашивания белков была отмечена у образцов с 10,00 % содержанием говядины (рисунок 11 D). Среди выявленных конститутивных фракций, представленных на рисунке 12, наибольшей интенсивностью окрашивания характеризовались белковые пятна 2, 6, 7 и 17, являющиеся в соответствии с базой данных «Протеомика мышечных органов»

[Kovaleva et. al., 2013] тропомиозином альфа 1 (33,5 кДа), бета-енолазой (46,0 кДа) креатинкиназой субъединицей М (MW 41,0 кДа) и тропонином Т скелетномышечным (31,0 кДа), соответственно [Ахремко, 2019].

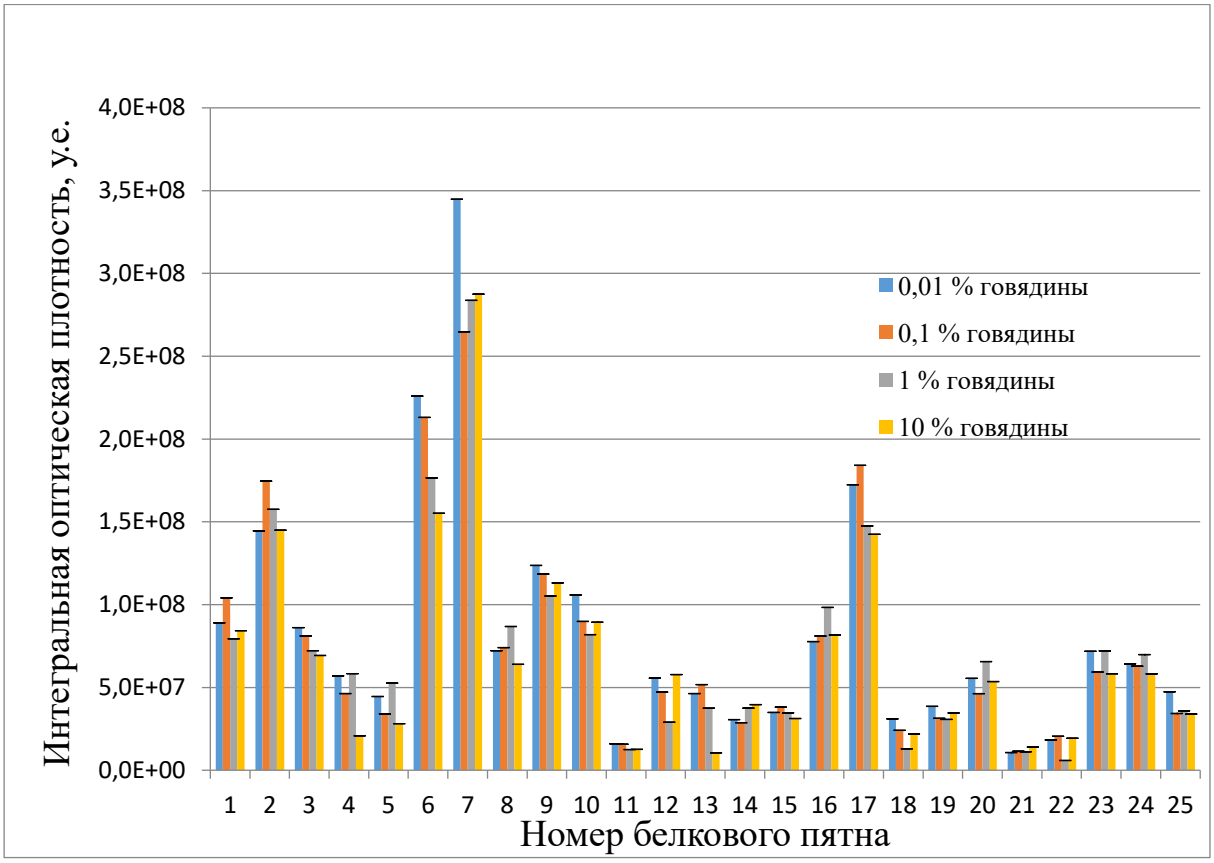


Рисунок 12 – Профиль экспрессии белковых фракций.

Линейная зависимость от процентного содержания говядины в модельном фарше отмечалась у белков 3 и 6, являющихся миозиновой легкой цепью 1/3 (21,5 кДа) и бета-енолазой (46,0 кДа). Их количественное содержание снижалось на 19,52 % и 31,34 % при увеличении доли говядины в фарше от 0,01 % до 10,00 %, соответственно. Данные фракции могут выступать в качестве кандидатов-биомаркеров при оценке состава мясных продуктов, поскольку на двумерных электрофореграммах модельных фаршей отмечена линейная зависимость интенсивности указанных белковых пятен при изменении количества говядины. Зарубежными коллегами уже проводились исследования миозиновых легких цепей в качестве маркера качества мяса, но вопрос ещё не изучен в полной мере [Bazile et. al., 2019]. Также на рисунке 13 представлены фрагменты двумерных

электрофореграмм, в которых отмечена тенденция снижения интенсивности окраски белковых фракций при увеличении количества мяса говядины.

Отмечено, что во фракциях 4 и 5 происходило равномерное снижение интенсивности пятен. Это может быть связано с тем, что в свинине данные белки более выражены и с увеличением количества говядины их содержание в образце уменьшалось. Также в области белковых пятен № 19–25 в зависимости от состава фарша происходила деградация белковых молекул и небольшое смещение изоэлектрических точек. У фракции № 22 эти изменения более выражены. Возможно, данные изменения происходят из-за агрегации белковых молекул.

Таким образом, бета-енолаза и изоформы миозиновых легких цепей могут использоваться в качестве биомаркеров при оценке состава мясных продуктов, поскольку на двумерных электрофореграммах модельных фаршей отмечено равномерное изменение интенсивности указанных белковых пятен при увеличении доли говядины, что подтверждено компьютерной денситометрией.

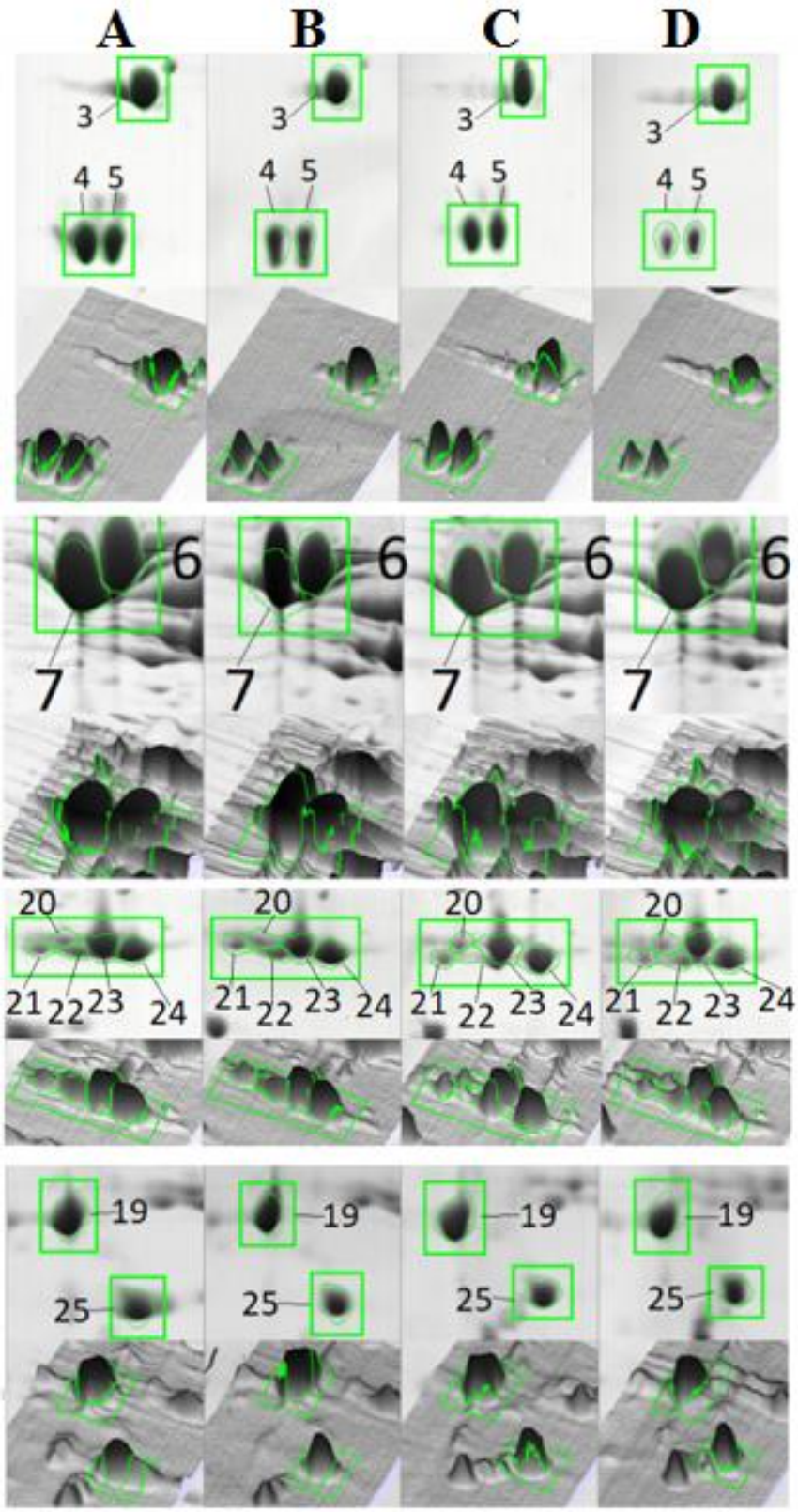


Рисунок 13 – Фрагменты двумерных электрофореграмм модельных фаршей из свиньи с добавлением говядины (*l. dorsi*) с процентным соотношением: A – 0,01 : 99,99 %; B – 0,1 : 99,9 %; C – 1,0 : 99,0 %; D 10,0 : 90,0 %.

.

3.3.2. Изучение воздействия различных температур (замораживание и тепловая обработка) в мясных системах путем сравнительного анализа двумерных карт

Известно, что внедрение технологий обработки с различными вариациями температуры имеет решающее значение на технологические характеристики мяса [Chernukha et. al., 2016]. Условия обработки, особенно температура, вызывают каскад химических и физических изменений, влияющих на белки мяса. Происходящие модификации белка включают денатурацию и агрегацию [Федулова, 2018], усадку волокон и солюбилизацию коллагена [Tornberg, 2005], реакции Майяра или окисление белка [Roldan et. al., 2014]. Таким образом, диапазон используемых температурных условий для обработки мяса и его дальнейшего приготовления приводит к потенциально различным воздействиям на модификацию белка.

Если мясные продукты подвергаются воздействию активных форм кислорода, то окислительный стресс индуцируется белками, которые вызывают химическое разрушение, изменение функциональности белка, потерю незаменимых аминокислот и, возможно, усвояемости продукта [Utrera et. al., 2014]. С появлением окисления не только основные и ароматические аминокислоты превращаются в карбонильные, но тиольные группы заменяются образованием дисульфидных мостиков, которые запускают полимеризацию и последующую агрегацию белков. Окисление ароматических аминокислот может привести к денатурации, полимеризации, образованию агрегатов, фрагментации, изменениям в гидрофобности, растворимости, гелеобразовании и эмульгировании, что в конечном итоге влияет на физико-химическое состояние белков [Berardo et. al., 2015].

Основная цель настоящего этапа исследования состояла в том, чтобы понять, как воздействие различных температур (замораживание и тепловая обработка) может вызвать биохимические изменения в мясных системах, которые могут

повлиять на пищевые качества мясных белков путем сравнительного анализа двумерных карт.

Двумерные электрофореграммы исследуемых фаршей, представленные на рисунке 14, показали сходное распределение фракций, соотносимое с многомодульной базой данных «Протеомика мышечных органов» [Kovaleva et. al., 2013], касательно *Sus scrofa*. Наибольшее количество белковых фракций наблюдалось у нативного (сырого) фарша, в то время как у образца после заморозки отмечено заметное снижение количества белков. Выявлена декомпозиция группы белковых фракций с диапазоном молекулярных масс от 65 кДа до 250 кДа у фарша после тепловой обработки (рисунок 14). Интересно, что не обнаруживался тропомиозин β-цепь (ТПМ2 33,5 кДа; pI 4,80) после заморозки. При этом фракция тропомиозина альфа 1 (ТПМ1 33,5 кДа; pI 4,71) сохранялась у всех образцов.

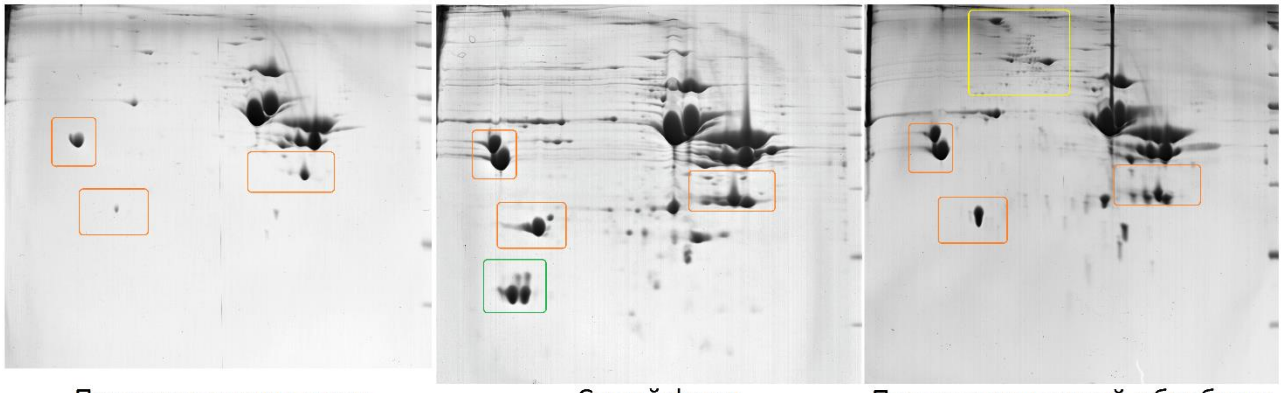


Рисунок 14 – 2ДЭФ фаршей после различной термической обработкой.

Также наблюдалось деградационное влияние на миозиновые легкие цепи 2 (МЛЦ2 18,5 кДа; pI 4,89) как при отрицательной температуре, так и при положительной. Схожая картина происходила с фракцией триозофосфатизомеразой 1 (ТПИ1 23,0 кДа; pI 6,80), которая интенсивно выражена в сыром фарше, отсутствовала в образце после заморозки и обнаруживалась в небольшом количестве в вареном фарше. Наблюдалось равномерное снижение интенсивности окрашивания белковых пятен кароангидразы 3 (30,5 кДа; pI 7,55), αβ-кристаллина (20,0 кДа; pI 7,60) и миозиновой легкой цепи 1 (МЛЦ1 21,0 кДа; pI 4,90) от нативного фарша до замороженного.

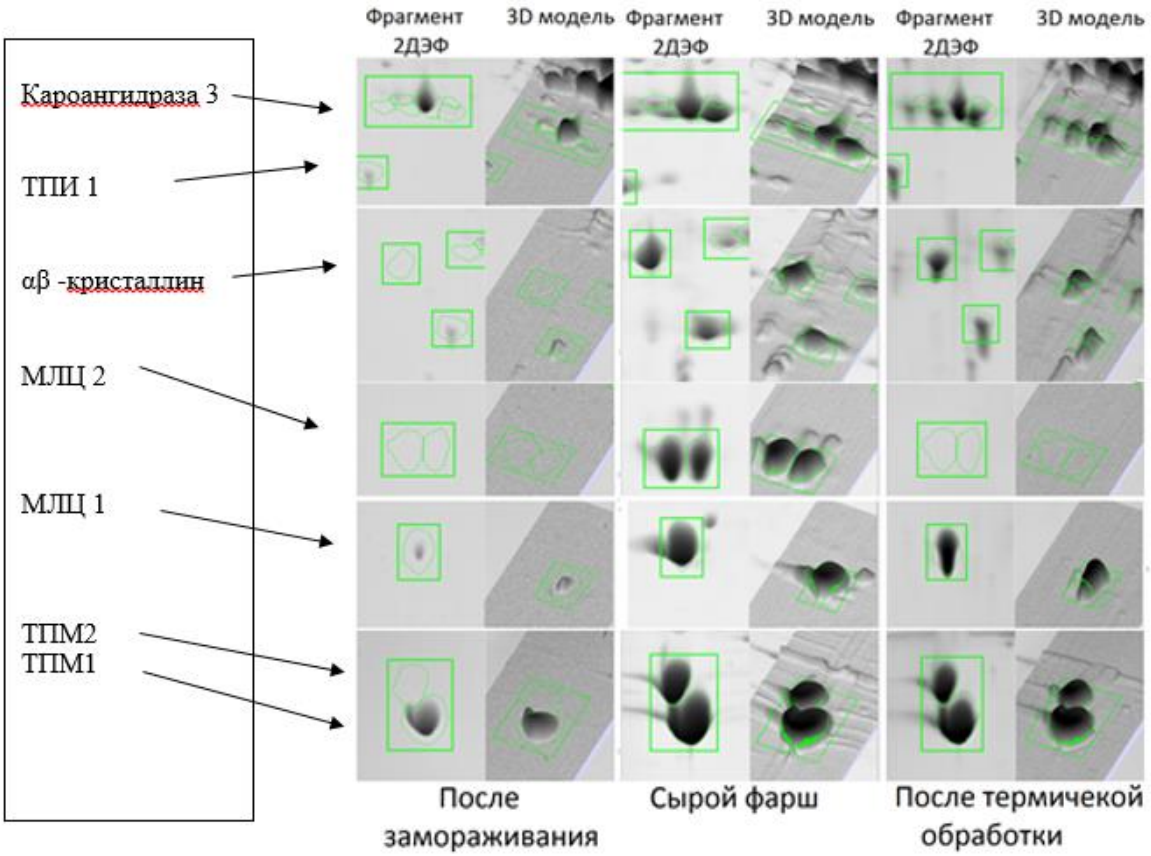


Рисунок 15 – Укрупненные фрагменты 2ДЭФ.

Различная термическая обработка мясных систем по-разному влияет на белковый профиль, в частности на количество белков и их интенсивность окрашивания. Посредством протеомного анализа методом двумерного электрофореза обнаружено наибольшее количество фракций с выраженной интенсивностью белковых пятен в нативном сыром фарше. В случае замораживания образца теряется часть белковых соединений (триозофосфатизомераза 1, миозиновые легкие цепи 2 и тропомиозин β-цепь), что вызвано механическим воздействием кристаллов воды на стенки мышечных волокон и денатурацией белков в результате отделения воды от белковой субстанции. Выявлено, В образце фарша после тепловой обработки выявлена декомпозиция группы белковых фракций с диапазоном молекулярных масс от 65 кДа до 250 кДа, соединения распадались на наборы пятен одноименных фракций, присутствующих в нативном фарше, а часть белков не детектировались на 2Д-электрофореграмме: МЛЦ3 (16,8 кДа; pI 4,53), белок, связывающий жирные кислоты 3 (мышечная изоформа 13,0 кДа; pI 5,60), аденилаткиназа изоэнзим 1 (23,0

кДа; pI 6,40), альфа субъединица гемоглобина (15,5 кДа; pI 9,15) и другие минорные фракции. Фракция тропомиозина альфа 1 (ТПМ1 33,5 кДа; pI 4,71) сохранялась во всех образцах. [Chernukha et. al., 2016].

Такие интерпретации могут обеспечить понимание влияния различных стратегий обработки пищевых продуктов и акцентировать внимание на биофункциональных и питательных качествах белков мяса.

3.4. Результаты протеомных исследований готовых мясных продуктов – кусковых мясных консервов

Исследования качественных показателей кусковых мясных консервов в соответствии с ГОСТ 26671-2014 производится в средней пробе образца, но при изучении протеомными методами такой пробоотбор не позволяет получить качественное разделение белковых компонентов из-за большого содержания жира в продукте. Для повышения разрешающей способности метода было предложено отделить жир по ГОСТ 33741-2015 и провести исследования отдельных составляющих, более подробно описано в Приложении 4. На рисунке 16 и в Приложении 5 представлены результаты двумерного электрофореза кусковых консервов из говядины в средней пробе, отдельно бульона, отдельно кусочков мяса и совмещенно бульона и мяса (в соотношении 30% бульона и 70% мясной составляющей консервов).

В случае, когда исследования проводили в средней пробе (рисунок 16 А), были обнаружены в небольших количествах фрагменты основных мышечных и соединительнотканных белков говядины, но из-за большого количества жира, который обладает плохой электропроводностью, электрофореграмма была малоинформативной. Значительно лучшего разделения удалось добиться после удаления жировой фракции из продукта, поскольку мышцы, кровеносные сосуды и кости содержат много воды, и являются хорошим проводником электрического тока.

При электрофоретическом изучении бульона (рисунок 16 В) из мясных консервов было выявлено большое количество интенсивно окрашенных

высокомолекулярных белковых фракций с массой более 50 кДа, вероятно, это были коллагеновые цепи из соединительной ткани. Наиболее информативную картину удалось получить при исследовании кусочков мяса (рисунок 16 Г) из консервов. Было выявлено большое количество белков во всем диапазоне молекулярных масс полиакриламидного геля.

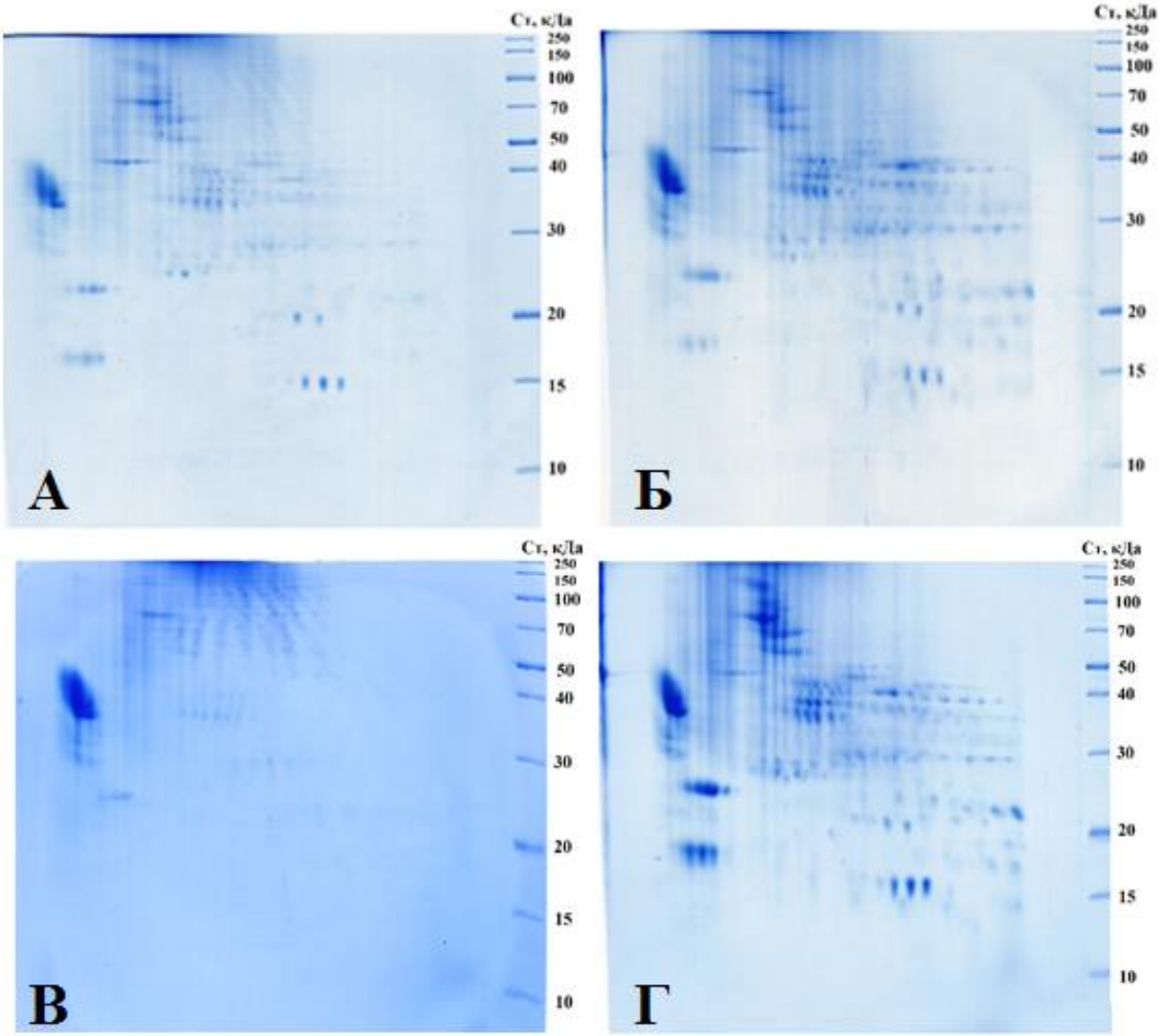


Рисунок 16 – 2ДЭФ мясных кусковых консервов (говядина) и их составляющих. Условные обозначения: А – смесь говяжья (средняя проба); Б – мясо и бульон; В – бульон; Г – кусочки мяса.

Для первичного скрининга белковой составляющей мясных кусковых консервов оптимально использовать вариант электрофоретического разделения бульона совместно с кусочками мяса, удалив жировую составляющую (рисунок 16 Б).

Схожая тенденция распределения белковых фракций была получена при анализе двумерных электрофореграмм кусковых консервов из свинины: в средней пробе, отдельно бульона, отдельно кусочков мяса и совмещенно бульона и мяса (рисунок 17, Приложение 6). Электрофореграмма средней пробы (рисунок 17 А) была мало информативна, как и отдельное изучение бульона (рисунок 17 В).

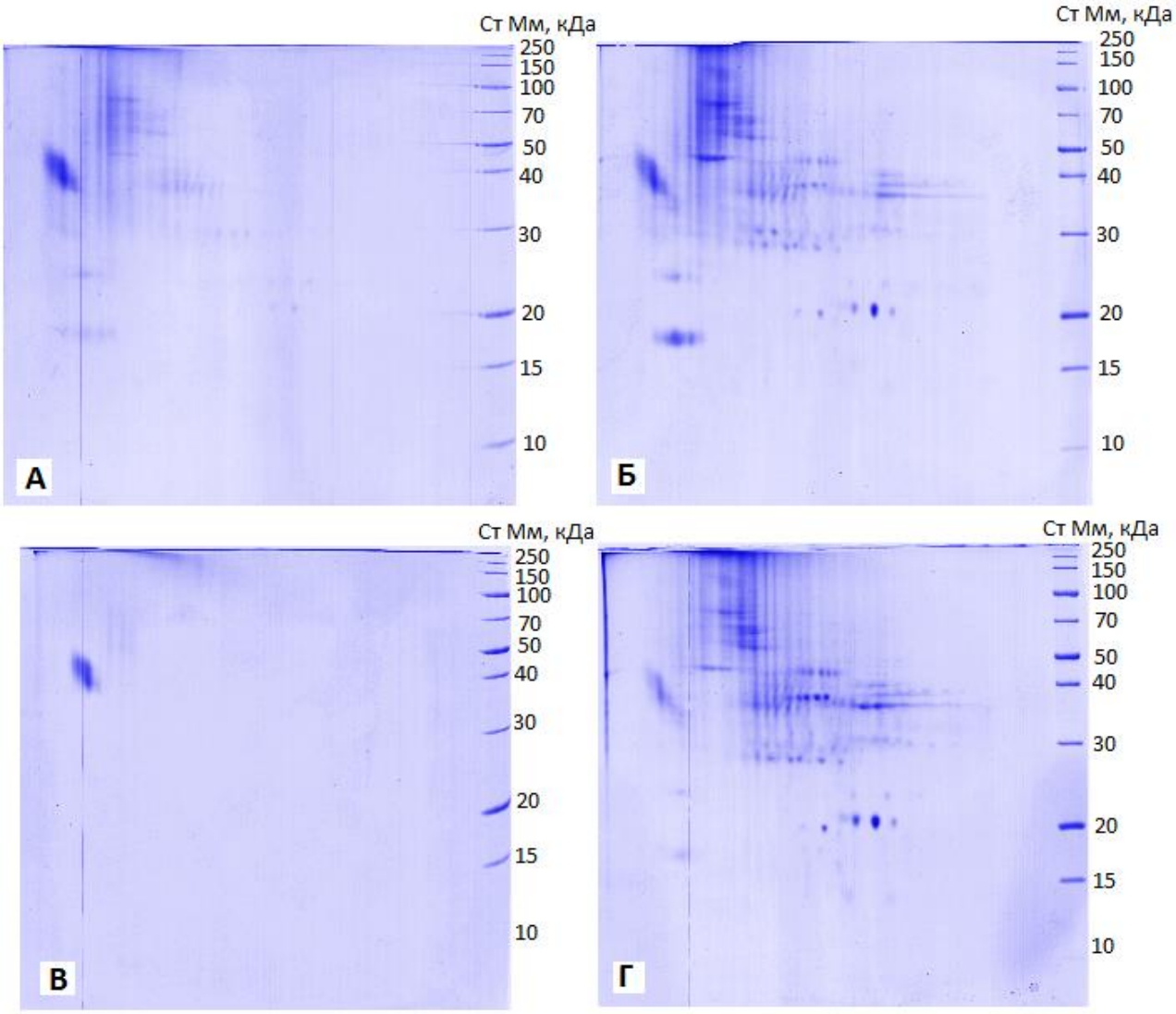


Рисунок 17 – 2ДЭФ мясных кусковых консервов (свинина) и их составляющих. Условные обозначения: А – смесь (средняя проба); Б – мясо и бульон; В – бульон; Г – кусочки мяса.

Наибольшее распределение белков выявлено при отдельном изучении кусочков мяса (рисунок 17 Г), достаточно хорошо обнаруживались белки-предшественники основных мышечных белков свиньи (МЛЦ, тропонины, тропомиозины, бета-

енолаза, глицеральдегид трифосфатизомераза и др.). Также высокого разрешения электрофореграммы удалось достичь при совмещенном изучении бульона и кусочков мяса (рисунок 17 Б), более интенсивно проявлялись кислотные белки.

3.5. Экономическая эффективность

Оценка экономической эффективности использования методики «Определение белкового профиля мяса или мясных продуктов методом двумерного электрофореза» проводился путем расчета стоимости используемых реактивов, аренды используемого оборудования и лабораторной посуды. Подробные результаты расчета приведены в Приложении 7.

Результаты расчёта показали, что суммарные затраты на проведение протеомных исследований «Определение белкового профиля мяса или мясных продуктов методом двумерного электрофореза» составили 1640,38 рублей за один образец.

Полученные данные позволяют рекомендовать методику для проведения протеомных исследований, как полуколичественный скрининговый метод определения белкового состава мяса и мясных продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты анализа литературных данных и экспериментальных исследований показали, что наиболее информативным вариантом для разделения белков мышечной ткани с помощью двумерного электрофореза является анодный вариант, когда изменено направление тока. В качестве инкубирующих растворов ИЭФ-гелей могут выступать буфер А (5 М мочевина, 2% SDS, 5% меркаптоэтанол, 62,5 мМ Tris-HCl, 0,01% бромфеноловый синий) и выравнивающие буферы (6 М мочевина, 20% глицерина, 2% SDS и 1% DTT(I) / 4% йодацетамид (II) в 375 мМ Трис-HCl). С помощью денситометрического анализа гелей подтверждена эффективность разработанного метода пробоподготовки: при таком варианте выявляется, как минимум, в два раза большее количество белков и увеличивается интенсивность их проявления.

2. Сравнительные протеомные исследования мышц поросят-отъемышей и взрослых животных показали, что в процессе роста и развития происходит увеличение числа фракций тропонинов, легких миозиновых цепей и белков актомиозинового комплекса, но при этом происходит снижение их количественного содержания. Выявленные изменения белковых соединений отражают интенсивность процессов развития мышечной ткани у животных, способствующие контролю закономерностей формирования заданных качественных показателей мяса и мясных продуктов.

3. Посредством двумерного электрофореза выявлены основные группы модифицируемых мышечных белков модельных фаршевых систем после различных температурных воздействий. Отрицательная температура (минус 40 °С) приводит к потерям части структурных белковых соединений (триозофосфатизомеразы 1, миозиновых легких цепей 2 и тропомиозина β-цепь); тепловая обработка – к декомпозиции ряда белков с молекулярной массой выше 65 кДа (миозиновые легкие цепи 2 и миозиновые легкие цепи 3), а часть белков не детектировались на 2Д-электрофореграмме (МЛЦ3, белок, связывающий жирные кислоты, 3 мышечная изоформа, аденилаткиназа изозим 1, альфа субъединица гемоглобина).

4. Адаптированы условия разделения белковой составляющей для кусковых мясных консервов. Посредством разделения и удаления жировой составляющей продукта получены их протеомные карты. Для определения общего спектра белков целесообразно электрофоретическое изучение совмещенно бульона и кусочков мяса. Изучение компонентов консервов методом двумерного электрофореза позволяет в отношении бульона проводить сравнительный анализ длинноцепочечных белков; в отношении мясной составной части изучить вариации тканевых белков.

5. Разработаны и утверждены методические рекомендации по анализу результатов одно- и двумерных электрофореграмм, позволяющие интерпретировать полученные результаты после проведения электрофоретического исследования, используя информационные ресурсы. Разработан СТО 00419779-000-2021 Консервы кусковые мясные и мясосодержащие. Методика подготовки проб для проведения 2D – электрофореза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПТМ – посттрансляционных модификаций

МЛЦ, MLC – миозиновые легкие цепи

MLC1f – МЛЦ быстрых скелетных мышц

MLC1s/v – МЛЦ медленных скелетных мышц

ТПИ1 – триозофосфатизомераза 1

ТПМ2 – тропомиозин β-цепь

ТПМ1 – тропомиозина альфа 1

PMF – фингерпринт пептидной массы

PFF – пептидная фрагментация

2-DE, 2-ДЭ – двумерный гель-электрофорез

2-ДЭФ – двумерная электрофореграмма

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

MC, MS – масс-спектр, масс-спектрометрия

MC/MC, MS/MS – тандемная масс-спектрометрия

Tris, трис- – трис(гидроксиметил)аминометан

SDS – додецилсульфат натрия

DTT – дитиотреитол

PAGE, ПААГ – полиакриламидный гель

кДа, kDa – килодальтон

Мм, Mm – молекулярная масса

pI – изоэлектрическая точка

SDS-PAGE – электрофорез в ПААГ в присутствии SDS

IEF, ИЭФ – изоэлектрофокусирование

IEF-PAGE – электрофорез в градиенте pH, созданном амфолинами

1-DE – одномерный электрофорез

МАЛДИ, MALDI Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MS/MS, MC/MC – тандемная масс-спектрометрия

Time of Flight (TOF) – времяпролетный

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ackermann D. Comparative fluorescence two-dimensional gel electrophoresis using a gel strip sandwich assembly for the simultaneous on-gel generation of a reference protein spot grid / D. Ackermann, W. Wang, B. Streipert, B. Geib, L. Grün, S. König // Electrophoresis. – 2012. – Vol. 33. – №. 9-10. – P. 1406-1410.

2. Akhremko A., Fedulova L. Comparative study of weaning pigs' muscle proteins using two-dimensional electrophoresis / A. Akhremko, L. Fedulova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2021. - Vol. 15. - P. 52-57. https://doi.org/10.5219/1449

3. Akhremko A., Vasilevskaya E., Fedulova L. Adaptation of two-dimensional electrophoresis for muscle tissue analysis // A. Akhremko, E. Vasilevskaya, L. Fedulova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2020. – Vol. 14. – №. 1. – P. 595-601. https://doi.org/10.5219/1380.

4. Alderton A.L. Induction of redox instability of bovine myoglobin by adduction with 4-hydroxy-2-nonenal / A.L. Alderton, C. Faustman, D.C. Liebler, D.W. Hill // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – №. 15. – P. 4398-4405.

5. Andersson M. Imaging mass spectrometry of proteins and peptides: 3D volume reconstruction / M. Andersson, M.R. Groseclose, A.Y. Deutch, R.M. Caprioli // Nature methods. – 2008. – Vol. 5. – №. 1. – P. 101-108. https://doi.org/10.1038/nmeth1145.

6. Andjelković U., Josić D. Mass spectrometry based proteomics as foodomics tool in research and assurance of food quality and safety //Trends in Food Science & Technology. – 2018. – Vol. 77. – P. 100-119. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.008/

7. Arena S. Dairy products and the Maillard reaction: A promising future for extensive food characterization by integrated proteomics studies / S. Arena, G. Renzone, C. D’Ambrosio, A.M. Salzano, A. Scaloni // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 219. – P. 477-489.

8. Baehr L.M. Muscle-specific and age-related changes in protein synthesis and protein degradation in response to hindlimb unloading in rats / L.M. Baehr, D.W. West,

A.G. Marshall, G.R. Marcotte, K. Baar, S.C. Bodine // Journal of applied physiology. – 2017. – Vol. 122. – № 5. – P. 1336-1350.

9. Baggerman G. Gel-based versus gel-free proteomics: a review / G. Baggerman, E. Vierstrate, A. De Loof, L. Schoofs // Combinatorial chemistry & high throughput screening. – 2005. – Vol. 8. – №. 8. – P. 669-677.

10. Bassols A., Bendixen E., Miller I. From farm to fork: Proteomics in farm animal care and food production // Proteomics in Food Science. – Academic Press, 2017. – P. 145-161.

11. Bazile J. Pathways and biomarkers of marbling and carcass fat deposition in bovine revealed by a combination of gel-based and gel-free proteomic analyses / J. Bazile, B. Picard, C. Chambon, A. Valais, M. Bonnet // Meat science. – 2019. – Vol. 156. – P. 146-155.

12. Bencivenni M. Electrospray MS and MALDI imaging show that non-specific lipid-transfer proteins (LTPs) in tomato are present as several isoforms and are concentrated in seeds / B. Bencivenni, A. Faccini, R. Zecchi, F. Boscaro, J. Moneti, A. Dossena, S. Sforza // Journal of Mass Spectrometry. – 2014. – Vol. 49. – №. 12. – P. 1264-1271. https://doi.org/10.1002/jms.3454.

13. Bendixen E. The use of proteomics in meat science //Meat science. – 2005. – Vol. 71. – №. 1. – P. 138-149. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.013.

14. Berardo A. Protein oxidation affects proteolysis in a meat model system / A. Berardo, E. Claeys, E. Vossen, F. Leroy, S. De Smet // Meat science. – 2015. – Vol. 106. – P. 78-84.

15. Boersema P. J. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics / P.J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A.J. Heck //Nature protocols. – 2009. – Vol. 4. – №. 4. – P. 484-494. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.21

16. Boschetti E. Combinatorial peptide ligand libraries and plant proteomics: a winning strategy at a price / E. Boschetti, L.V. Bindschedler, C. Tang, E. Fasoli, P.G. Righetti // Journal of chromatography A. – 2009. – Vol. 1216. – №. 8. – P. 1215-1222.

17. Bouley J. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy / J. Bouley, B. Meunier, C. Chambon, S. De Smet, J.F. Hocquette, B. Picard // Proteomics. – 2005. – Vol. 5. – №. 2. – P. 490-500.

18. Brun V. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics / V. Brun, A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch, J. Garin, //Molecular & Cellular Proteomics. – 2007. – Vol. 6. – №. 12. – P. 2139-2149. https://doi.org/10.1074/mcp.M700163-MCP200.

19. Calvano C.D. Proteomic approach based on MALDI-TOF MS to detect powdered milk in fresh cow's milk / C.D. Calvano, A. Monopoli, P. Loizzo, M. Faccia, C. Zambonin // Journal of agricultural and food chemistry. – 2013. – Vol. 61. – №. 8. – P. 1609-1617. https://doi.org/10.1021/jf302999s.

20. Canto A.C. Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef Longissimus lumborum color stability / A.C. Canto, S.P. Suman, M.N. Nair, S. Li, G. Rentfrow, C.M. Beach, T.J.P. Silva, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, A. Grayson, R.O. McKeith, A. King // Meat science. – 2015. – Vol. 102. – P. 90-98.

21. Capozzi F., Trimigno A., Ferranti P. Proteomics and metabolomics in relation to meat quality //Poultry Quality Evaluation. – Woodhead Publishing, 2017. – P. 221-245.

22. Carbonaro M. Proteomics: present and future in food quality evaluation /M. Carbonaro // Trends in Food Science & Technology. – 2004. – Vol. 15. – №. 3-4. – P. 209-216. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.020

23. Cardello A.V. Food quality: relativity, context and consumer expectations / A.V. Cardello // Food quality and preference. – 1995. – Vol. 6. – №. 3. – P. 163-170. https://doi.org/10.1016/0950-3293(94)00039-X.

24. Cavatorta V. Unambiguous characterization and tissue localization of Pru P 3 peach allergen by electrospray mass spectrometry and MALDI imaging / V. Cavatorta, S. Sforza, G. Mastrobuoni, G. Pieraccini, S. Francese, G. Moneti, A. Dossena, E.A. Pastorello, R. Marchelli // Journal of mass spectrometry. – 2009. – Vol. 44. – №. 6. – P. 891-897. https://doi.org/10.1002/jms.1562.

25. Chernukha I.M., Akhremko A.G. Assessing the effect of thermal treatment on meat proteins using proteomic methods / I.M. Chernukha, A.G. Akhremko //Theory and practice of meat processing. – 2019. – Vol. 4. – №. 3. – P. 4- 6.

26. Colgrave M.L., Byrne K., Howitt C.A. Food for thought: Selecting the right enzyme for the digestion of gluten // Food chemistry. – 2017. – Vol. 234. – P. 389-397.

27. Cox J., Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification // Nature biotechnology. – 2008. – Vol. 26. – №. 12. – P. 1367-1372.

28. Cunsolo V. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial / V. Cunsolo, V. Muccilli, R. Saletti, S. Foti // Journal of Mass Spectrometry. – 2014. – Vol. 49. – №. 9. – P. 768-784.

29. Cunsolo V. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial //Journal of Mass Spectrometry. – 2014. – Vol. 49. – №. 9. – P. 768-784. https://doi.org/10.1002/jms.3374/

30. D’Alessandro A., Zolla L. We are what we eat: food safety and proteomics //Journal of proteome research. – 2012. – Vol. 11. – №. 1. – P. 26-36. https://doi.org/10.1021/pr2008829/

31. D’Ambrosio C. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries / C. D’Ambrosio, S. Arena, A. Scaloni, L. Guerrier, E. Boschetti, M.E. Mendieta, A. Citterio, P.G. Righetti // Journal of proteome research. – 2008. – Vol. 7. – №. 8. – P. 3461-3474.

32. D'Alessandro A., Zolla L. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology / A. D'Alessandro, L. Zolla // Journal of proteomics. – 2013. – Vol. 78. – P. 558-577.

33. Deb-Choudhury S. Effect of cooking on meat proteins: mapping hydrothermal protein modification as a potential indicator of bioavailability / S. Deb-Choudhury, S. Haines, D. Harland, S. Clerens, C. van Koten, J. Dyer // Journal of agricultural and food chemistry. – 2014. – Vol. 62. – №. 32. – P. 8187-8196.

34. Desai M.A. Proteome basis of pale, soft, and exudative-like (PSE-like) broiler breast (Pectoralis major) meat / M.A. Desai, V. Jackson, W. Zhai, S.P. Suman,

M.N. Nair, C.M. Beach, M.W. Schilling // Poultry science. – 2016. – Vol. 95. – №. 11. – P. 2696-2706.

35. Di Luca A. 2D DIGE proteomic analysis of early post mortem muscle exudate highlights the importance of the stress response for improved water-holding capacity of fresh pork meat / A. Di Luca, G. Elia, R. Hamill, A.M. Mullen // Proteomics. – 2013. – Vol. 13. – №. 9. – P. 1528-1544.

36. Di Luca A. Comparative proteomic profiling of divergent phenotypes for water holding capacity across the post mortem ageing period in porcine muscle exudate / A. Di Luca, R.M. Hamill, A.M. Mullen, N. Slavov, G. Elia // PloS one. – 2016. – Vol. 11. – №. 3. – P. e0150605.

37. Di Luccia A. Protein Modifications in Cooked Pork Products / A. Di Luccia, B. La Gatta, M. Rutigliano, G. Rusco, R. Gagliardi, G. Picariello // Proteomics in Food Science. – Academic Press, 2017. – P. 199-214.

38. Di Luccia A. Proteomic analysis of water soluble and myofibrillar protein changes occurring in dry-cured hams / A. Di Luccia, G. Picariello, G. Cacace, A. Scaloni, M. Faccia, V. Liuzzi, G. Alviti, S.S. Musso // Meat Science. – 2005. – Vol. 69. – №. 3. – P. 479-491.

39. Dosi R. Rapid primary structure determination of myoglobins by a complementary approach based on mass spectrometry and Edman degradation / R. Dosi, A. Carusone, A. Chambery, V. Severino, A. Parente, A.Di Maro // Food chemistry. – 2012. – Vol. 133. – №. 4. – P. 1646-1652.

40. Duong-Ly K.C., Gabelli S.B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation / K.C. Duong-Ly, S.B. Gabelli // Methods in enzymology. – 2014. – Vol. 541. – P. 85-94. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.

41. Eng J.K., McCormack A.L., Yates J.R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database / J.K. Eng, A.L. McCormack, J.R. Yates // Journal of the american society for mass spectrometry. – 1994. – Vol. 5. – №. 11. – P. 976-989. https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)80016-2

42. Esteve C. Identification of avocado (Persea americana) pulp proteins by nano-LC-MS/MS via combinatorial peptide ligand libraries / C. Esteve, A.D’Amato,

M.L. Marina, M.C. García, P.G. Righetti // Electrophoresis. – 2012a. – Vol. 33. – №. 18. – P. 2799-2805.

43. Esteve C. Identification of olive (Olea europaea) seed and pulp proteins by nLC-MS/MS via combinatorial peptide ligand libraries / C. Esteve, A. D'Amato, M.L. Marina, M.C. García, A. Citterio, P.G. Righetti // Journal of proteomics. – 2012б. – Vol. 75. – №. 8. – P. 2396-2403.

44. FAOSTAT, 2020 Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org/faostat.

45. Fasoli E. In-depth proteomic analysis of non-alcoholic beverages with peptide ligand libraries. I: Almond milk and orgeat syrup / E. Fasoli, A.D'Amato, A.V. Kravchuk, A. Citterio, P.G. Righetti // Journal of proteomics. – 2011. – Vol. 74. – №. 7. – P. 1080-1090.

46. Franco D. Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress / D. Franco, A. Mato, F.J. Salgado, M. López-Pedrouso, M. Carrera, S. Bravo, M. Parrado, J.M. Gallardo, C. Zapata // Journal of proteomics. – 2015. – Vol. 122. – P. 73-85.

47. Gagaoua M. Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal / M. Gagaoua, E.M.C. Terlouw, A. Boudjellal, B. Picard // Journal of Proteomics. – 2015. – Vol. 128. – P. 365-374.

48. Gallego M. The use of label-free mass spectrometry for relative quantification of sarcoplasmic proteins during the processing of dry-cured ham / M. Gallego, L. Mora, M.C. Aristoy, F. Toldrá // Food chemistry. – 2016. – Vol. 196. – P. 437-444.

49. Gärdén P., Alm R., Häkkinen J. PROTEIOS: an open source proteomics initiative // Bioinformatics. – 2005. – Vol. 21. – №. 9. – P. 2085-2087.

50. Geisslitz S., Scherf K. A. Proteomics in Food Quality / S. Geisslitz, K.A. Scherf // Reference Module in Food Science. – 2020. – Vol. 1. – P.699-717. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22762-5.

51. Giansanti P. Six alternative proteases for mass spectrometry–based proteomics beyond trypsin / P. Giansanti, L. Tsiatsiani, T.Y. Low, A.J. Heck // Nature protocols. – 2016. – Vol. 11. – №. 5. – P. 993-1006.

52. Giusti A. M., Bignetti E., Cannella C. Exploring new frontiers in total food quality definition and assessment: From chemical to neurochemical properties //Food and Bioprocess Technology. – 2008. – Vol. 1. – №. 2. – P. 130-142. https://doi.org/10.1007/s11947-007-0043-9.

53. Goldring J.P.D. Concentrating Proteins by Salt, Polyethylene Glycol, Solvent, SDS Precipitation, Three-Phase Partitioning, Dialysis, Centrifugation, Ultrafiltration, Lyophilization, Affinity Chromatography, Immunoprecipitation or Increased Temperature for Protein Isolation, Drug Interaction, and Proteomic and Peptidomic Evaluation / J.P.D. Goldring // Electrophoretic Separation of Proteins. – Humana Press, New York, NY, 2019. – P. 41-59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_4.

54. Gómez I. The effects of processing and preservation technologies on meat quality: Sensory and nutritional aspects / I. Gómez, R. Janardhanan, F.C. Ibañez, M.J. Beriain // Foods. – 2020. – Vol. 9. – № 10. – P. 1416. https://doi.org/10.3390/foods9101416

55. Grassl J., Taylor N.L., Millar A.H. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging / Y. Wang, D. Wang, P. Shi, K. Omasa // Plant methods. – 2011. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-11. https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-21.

56. Guillemin N. Functional analysis of beef tenderness / N. Guillemin, M. Bonnet, C. Jurie, B. Picard // Journal of proteomics. – 2011. – Vol. 75. – №. 2. – P. 352-365.

57. Hernández-Ledesma B. Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion / B. Hernández-Ledesma, L. Amigo, M. Ramos, I. Recio // Journal of Chromatography A. – 2004. – Vol. 1049. – №. 1-2. – P. 107-114. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.025.

58. International Standard Organization. (2018). ISO 22000:2018 Food safety management systems-Requirements for any organiza-tion in the food chain. ISO.org, https://www.iso.org/standard/65464.html

59. Jia X. Peroxiredoxin-6—a potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle / X. Jia, E. Veiseth-Kent, H. Grove, P. Kuziora, L. Aass, K.I. Hildrum, K. Hollung // Journal of Animal Science. – 2009. – Vol. 87. – №. 7. – P. 2391-2399.

60. Jorrín-Novo J.V. Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms / J.V. Jorrín-Novo, J. Pascual, R. Sánchez-Lucas, M.C. Romero-Rodríguez, M.J. Rodríguez-Ortega, C. Lenz, L. Valledor // Proteomics. – 2015. – Vol. 15. – №. 5-6. – P. 1089-1112.

61. Joseph P. Proteomics of muscle-specific beef color stability / P. Joseph, S.P. Suman, G. Rentfrow, S. Li, C.M. Beach // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2012. – Vol. 60. – №. 12. – P. 3196-3203.

62. Joseph P., Nair M. N., Suman S. P. Application of proteomics to characterize and improve color and oxidative stability of muscle foods / P. Joseph, M.N. Nair, S.P. Suman // Food Research International. – 2015. – Vol. 76. – P. 938-945.

63. Josić D. Detection of microbial toxins by-omics methods: A growing role of proteomics //Proteomics in Food Science. – Academic Press, 2017. – P. 485-506. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00029-1/

64. Kettenbach A.N., Rush J., Gerber S.A. Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope–labeled synthetic peptides / A.N. Kettenbach, J. Rush, S.A. Gerber // Nature protocols. – 2011. – Vol. 6. – № 2. – P. 175-186. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.196.

65. Kiemer L., Cesareni G. Comparative interactomics: comparing apples and pears? / L. Kiemer, G. Cesareni // Trends in biotechnology. – 2007. – Vol. 25. – №. 10. – P. 448-454. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.002.

66. Koontz L. TCA precipitation / L. Koontz //Methods in enzymology. – 2014. – Vol. 541. – P. 3-10. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00001-X.

67. Korte R., Brockmeyer J. Novel mass spectrometry approaches in food proteomics //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2017. – Vol. 96. – P. 99-106. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.010.

68. Kovaleva M. Muscle organs proteomics: multy-level database / M. Kovaleva L. Kovalev, K. Lisitskaya, L. Eremina, A. Ivanov, I. Krakhmaleva, E. Sadykhov, S. Shishkin // FEBS Journal. – 2013. – Vol. 280, Special Issue: SI Supplement: 1. – P. 488.

69. Lambert J.P. Proteomics: from gel based to gel free / J.P. Lambert, M. Ethier, J.C. Smith, D. Figeys // Analytical Chemistry. – 2005. – Vol. 77. – №. 12. – P. 3771-3788.

70. Lametsch R., Roepstorff P., Bendixen E. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat / R. Lametsch, P. Roepstorff, E. Bendixen // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – Vol. 50. – №. 20. – P. 5508-5512.

71. Lexhaller B., Colgrave M.L., Scherf K.A. Characterization and relative quantitation of wheat, rye, and barley gluten protein types by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // Frontiers in plant science. – 2019. – Vol. 10. – P. 1530.

72. Lexhaller B., Ludwig C., Scherf K.A. Comprehensive detection of isopeptides between human tissue transglutaminase and gluten peptides / B. Lexhaller, C. Ludwig, K.A. Scherf // Nutrients. – 2019. – Vol. 11. – №. 10. – P. 2263. https://doi.org/10.3390/nu11102263

73. Manning L., Soon J. M. Food safety, food fraud, and food defense: a fast evolving literature //Journal of food science. – 2016. – Vol. 81. – №. 4. – P. R823-R834. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13256/

74. Marino R. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds / R. Marino, M. Albenzio, A. Della Malva, M. Caroprese, A. Santillo, A. Sevi // Meat Science. – 2014. – Vol. 98. – №. 2. – P. 178-186.

75. Martens L. Human Proteome Organization Proteomics Standards Initiative: data standardization, a view on developments and policy / L. Martens, S. Orchard, R. Apweiler, H. Hermjakob // Molecular & Cellular Proteomics. – 2007. – Vol. 6. – №. 9. – P. 1666-1667.

76. Martínez-Maqueda D. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion / D. Martínez-Maqueda, B. Hernández-Ledesma, L. Amigo, B. Miralles, J.Á. Gómez-Ruiz // Proteomics in foods. – Springer, Boston, MA, 2013. – P. 21-50. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5626-1_2.

77. Martinović T. Foodborne pathogens and their toxins / T. Martinović, U. Andjelković, M. Š. Gajdošik, D. Rešetar, D. Josić // Journal of Proteomics. – 2016. – Vol. 147. – P. 226-235. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.029

78. Matsumoto H. Two-Dimensional Gel Electrophoresis by Glass Tube-Based IEF and SDS-PAGE / H. Matsumoto, H. Haniu, B.T. Kurien, N. Komori // Electrophoretic Separation of Proteins. – Humana Press, New York, NY, 2019. – P. 107-113.

79. McLafferty F.W. Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics / F.W. McLafferty // The FEBS journal. – 2007. – Vol. 274. – №. 24. – P. 6256-6268. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06147.x

80. Montowska M., Pospiech E. Species-specific expression of various proteins in meat tissue: proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species / M. Montowska, E. Pospiech // Food chemistry. – 2013. – Vol. 136. – №. 3-4. – P. 1461-1469.

81. Mora L., Gallego M., Toldrá F. New approaches based on comparative proteomics for the assessment of food quality / L. Mora, M. Gallego, F. Toldrá // Current Opinion in Food Science. – 2018. – Vol. 22. – P. 22-27. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.005

82. Morzel M. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: A central role of HSP27 isoforms / M. Morzel, C. Terlouw, C. Chambon, D. Micol, B. Picard // Meat Science. – 2008. – Vol. 78. – №. 3. – P. 297-304.

83. Moseley M.A. Scanning quadrupole data-independent acquisition, part A: qualitative and quantitative characterization / M.A. Moseley, C.J. Hughes, P.R. Juvvadi, E.J. Soderblom, S. Lennon, S.R. Perkins, J.W. Thompson, W.J. Steinbach, S.J.

Geromanos, J. Wildgoose, J.I. Langridge, K. Richardson, J.P.C. Vissers // Journal of proteome research. – 2018. – Vol. 17. – №. 2. – P. 770-779.

84. Nair M. N., Zhai C. Application of proteomic tools in meat quality evaluation // Meat Quality Analysis. – Academic Press, 2020. – P. 353-368.

85. Nair M.N. Proteome basis for intramuscular variation in color stability of beef semimembranosus / M.N. Nair, S.P. Suman, M.K. Chatli, S. Li, P. Joseph, C.M. Beach, G. Rentfrow // Meat science. – 2016. – Vol. 113. – P. 9-16.

86. Naveena B.M. In-gel and OFFGEL-based proteomic approach for authentication of meat species from minced meat and meat products / B.M. Naveena, D.S. Jagadeesh, V. Kamuni, M. Muthukumar, V.V. Kulkarni, M. Kiran, S. Rapole // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2018. – Vol. 98. – №. 3. – P. 1188-1196.

87. Neilson K. A. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry / K.A. Neilson, N.A. Ali, S. Muralidharan, M. Mirzaei, M. Mariani, G. Assadourian, A. Lee, S.C. van Sluyter, P.A. Haynes, //Proteomics. – 2011. – Vol. 11. – №. 4. – P. 535-553. https://doi.org/10.1002/pmic.201000553.

88. Nikhontha K. Fruit growth, endocarp lignification, and boron and calcium concentrations in Nam Hom (aromatic) coconut during fruit development / K. Nikhontha, K. Krisanapook, W. Imsabai // Journal of ISSAAS. – 2019. – Vol. 25. – №. 1. – P. 21-31.

89. O'Donovan C. High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL / C. O'Donovan, M.J. Martin, A. Gattiker, E. Gasteiger, A. Bairoch, R. Apweiler // Briefings in bioinformatics. – 2002. – Vol. 3. – №. 3. – P. 275-284.

90. Onyenweaku E.O., Ebai P.A., Fila W.A. Food Quality: A Comparison of the Proximate Content & Sensory Properties of Some Composite Flour Meals / E.O. Onyenweaku, P.A. Ebai, W.A. Fila / /Asian Food Science Journal. – 2020. – P. 32-40. https://doi.org/10.9734/afsj/2020/v16i230170.

91. Ortea I., O'Connor G., Maquet A. Review on proteomics for food authentication / I. Ortea, G. O'Connor, A. Maquet // Journal of Proteomics. – 2016. – Vol. 147. – P. 212-225. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.033.

92. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes / A. Pandey, M. Mann //Nature. – 2000. – Vol. 405. – №. 6788. – P. 837-846. https://doi.org/10.1038/35015709.

93. Paredi G., Mori F., Mozzarelli A. Proteomics of Meat Products //Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology. – Springer, Cham, 2018. – P. 297-309.

94. Pearce K.L. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes—A review / K.L. Pearce, K. Rosenvold, H.J. Andersen, D.L. Hopkins // Meat science. – 2011. – Vol. 89. – №. 2. – P. 111-124.

95. Peri C. The universe of food quality /C. Peri //Food quality and preference. – 2006. – Vol. 17. – №. 1-2. – P. 3-8. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.03.002.

96. Picard B. Skeletal muscle proteomics in livestock production / B. Picard, C. Berri, L. Lefaucheur, C. Molette, T. Sayd, C. Terlouw // Briefings in functional genomics. – 2010. – Vol. 9. – №. 3. – P. 259-278.

97. Picard B. Skeletal muscle proteomics in livestock production / B. Picard, C. Berri, L. Lefaucheur, C. Molette, T. Sayd, C. Terlouw // Briefings in functional genomics. – 2010. – Vol. 9. – №. 3. – P. 259-278.

98. Picard B., Gagaoua M. Proteomic investigations of beef tenderness / B. Picard, M. Gagaoua // Proteomics in food science. – 2017. – P. 177-197.

99. Picard B., Lefèvre F., Lebret B. Meat and fish flesh quality improvement with proteomic applications / B. Picard, F. Lefèvre, B. Lebret // Animal Frontiers. – 2012. – Vol. 2. – №. 4. – P. 18-25.

100. Piras C. Proteomics in food: quality, safety, microbes, and allergens / C. Piras // Proteomics. – 2016. – Vol. 16. – №. 5. – P. 799-815. https://doi.org/10.1002/pmic.201500369

101. Pischetsrieder M., Baeuerlein R. Proteome research in food science / M. Pischetsrieder, R. Baeuerlein // Chemical Society Reviews. – 2009. – Vol. 38. – №. 9. – P. 2600-2608. https://doi.org/10.1039/B817898B

102. Pratt J. M. Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes / J.M. Pratt, D.M. Simpson, M.K. Doherty, J. Rivers, S.J. Gaskell, R.J. Beynon // Nature protocols. – 2006. – Vol. 1. – №. 2. – P. 1029-1043. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.129.

103. Purslow P.P., Gagaoua M., Warner R.D. Insights on meat quality from combining traditional studies and proteomics / P.P. Purslow, M. Gagaoua, R.D. Warner // Meat Science. – 2021. – Vol. 174. – P. 108423.

104. Purwanto A., Asbari M., budi Santoso P. Influence of Transformational and Transactional Leadership Style toward Food Safety Management System ISO 22000: 2018 Performance of Food Industry in Pati Central Java //Inovbiz: Jurnal Inovasi Bisnis. – 2019. – Vol. 7. – №. 2. – P. 180-185. https://doi.org/10.35314/inovbiz.v7i2.1213

105. Roldan M. Effect of different temperature–time combinations on lipid and protein oxidation of sous-vide cooked lamb loins / M. Roldan, T. Antequera, M. Armenteros, J. Ruiz// Food chemistry. – 2014. – Vol. 149. – P. 129-136.

106. Ross P.L. Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents / P.L. Ross, Y.N. Huang, J.N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, D.J. Pappin //Molecular & cellular proteomics. – 2004. – Vol. 3. – №. 12. – P. 1154-1169. https://doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200.

107. Röst H. L. OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis // Nature methods. – 2016. – Vol. 13. – №. 9. – P. 741-748. https://doi.org/10.1038/nmeth.3959/

108. Ruebelt M.C. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of gentically modified crops. 3. Assessing unintended effects / M.C. Ruebelt, M. Lipp, T.L. Reynolds, J.J. Schmuke, J.D. Astwood, D. DellaPenna, K.H. Engel, K.D. Jany // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Vol. 54. – №. 6. – P. 2169-2177.

109. Sayd T. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development / T. Sayd, M. Morzel,

C. Chambon, M. Franck, P. Figwer, C. Larzul, P. Le Roy, G. Monin, P. Cherel, E. Laville // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Vol. 54. – №. 7. – P. 2732-2737.

110. Schalk K. Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and oats for use as reference materials / K. Schalk, B. Lexhaller, P. Koehler, K.A. Scherf // PloS one. – 2017. – Vol. 12. – №. 2. – P. e0172819. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172819.

111. Schalk K., Koehler P., Scherf K. A. Quantitation of specific barley, rye, and oat marker peptides by targeted liquid chromatography–mass spectrometry to determine gluten concentrations / K. Schalk, P. Koehler, K.A. Scherf // Journal of agricultural and food chemistry. – 2018. – Vol. 66. – №. 13. – P. 3581-3592. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05286.

112. Schilling B. Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation / B. Schilling, M.J. Rardin, B.X. MacLean, A.M. Zawadzka, B.E. Frewen, M.P. Cusack, D.J. Sorensen, M.S. Bereman, E. Jing, C.C. Wu, E. Verdin, C.R. Kahn, M.J. Maccoss, B.W. Gibson // Molecular & Cellular Proteomics. – 2012. – Vol. 11. – №. 5. – P. 202-214.

113. Schilling M.W. Proteomic approach to characterize biochemistry of meat quality defects / M.W. Schilling, S.P. Suman, X. Zhang, M.N. Nair, M.A. Desai, K. Cai, M.A. Ciaramella, P.J. Allen // Meat science. – 2017. – Vol. 132. – P. 131-138.

114. Schulz S. Advanced MALDI mass spectrometry imaging in pharmaceutical research and drug development / S. Schulz, M. Becker, M.R. Groseclose, S. Schadt, C. Hopf //Current opinion in biotechnology. – 2019. – Vol. 55. – P. 51-59. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.08.003.

115. Serim S., Haedke U., Verhelst S.H.L. Activity-based probes for the study of proteases: recent advances and developments / S. Serim, U. Haedke, S.H.L. Verhelst // ChemMedChem. – 2012. – Vol. 7. – №. 7. – P. 1146-1159. https://doi.org/10.1002/cmdc.201200057.

116. Skylas D.J. The wheat-grain proteome as a basis for more efficient cultivar identification / D.J. Skylas, L. Copeland, W.G. Rathmell, C.W. Wrigley // PROTEOMICS: International Edition. – 2001. – Vol. 1. – №. 12. – P. 1542-1546.

117. Stoeckli M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues / M. Stoeckli, P. Chaurand, D.E. Hallahan, R.M. Caprioli // Nature medicine. – 2001. – Vol. 7. – №. 4. – P. 493-496. https://doi.org/10.1038/86573.

118. Suman S.P. Improving beef color stability: Practical strategies and underlying mechanisms / S.P. Suman, M.C. Hunt, M.N. Nair, G. Rentfrow // Meat science. – 2014. – Vol. 98. – № 3. – P. 490-504. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.032

119. Tamura K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // Molecular biology and evolution. – 2011. – Vol. 28. – №. 10. – P. 2731-2739. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

120. Taylor C.F. The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) / C.F. Taylor, R. Apweiler, R. Aebersold, E.W. Deutsch, M.J. Dunn // Nature biotechnology. – 2007. – Vol. 25. – №. 8. – P. 887-893.

121. Terova G. Proteomic profiling of sea bass muscle by two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry/ G. Terova, S., Pisanu, T. Roggio, E. Preziosa, M. Saroglia, M.F. Addis // Fish physiology and biochemistry. – 2014. – Vol. 40. – №. 1. – P. 311-322.

122. Thompson A. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS / A. Thompson, J. Schäfer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, R. Johnstone, A.K. Mohammed, C.Hamon, // Analytical chemistry. – 2003. – Vol. 75. – №. 8. – P. 1895-1904. https://doi.org/10.1021/ac0262560.

123. Thulasiraman V. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands / V. Thulasiraman, S. Lin, L.

Gheorghiu, J. Lathrop, L. Lomas, D. Hammond, E. Boschetti // Electrophoresis. – 2005. – Vol. 26. – №. 18. – P. 3561-3571.

124. Tian X. Quality and proteome changes of beef M. longissimus dorsi cooked using a water bath and ohmic heating process / X. Tian, W. Wu, Q. Yu, M. Hou, F. Jia, X. Li, R. Dai // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2016. – Vol. 34. – P. 259-266.

125. Tornberg E.V.A. Effects of heat on meat proteins–Implications on structure and quality of meat products // Meat science. – 2005. – Vol. 70. – №. 3. – P. 493-508.

126. Thiede B. et al. Peptide mass fingerprinting / B. Thiede, W. Höhenwarter, A. Krah, J. Mattow, M. Schmid, F. Schmidt, P.R. Jungblut // Methods. – 2005. – Vol. 35. – №. 3. – P. 237-247. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.08.015

127. Ulrich S. Direct identification of edible insects by MALDI-TOF mass spectrometry / S. Ulrich, U. Kühn, B. Biermaier, N. Piacenza, K. Schwaiger, C. Gottschalk, M. Gareis // Food Control. – 2017. – Vol. 76. – P. 96-101. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.010.

128. Utrera M., Morcuende D., Estévez M. Temperature of frozen storage affects the nature and consequences of protein oxidation in beef patties / M. Utrera, D. Morcuende, M. Estévez // Meat science. – 2014. – Vol. 96. – №. 3. – P. 1250-1257.

129. van de Wiel D.F.M., Zhang W.L. Identification of pork quality parameters by proteomics / D.F.M. van de Wiel, W.L. Zhang // Meat Science. – 2007. – Vol. 77. – №. 1. – P. 46-54.

130. Wu W. Molecular understanding of meat quality through application of proteomics / W. Wu, Y. Fu, M. Therkildsen, X.M. Li, R.T. Dai // Food Reviews International. – 2015. – Vol. 31. – №. 1. – P. 13-28.

131. Wu W. Molecular understanding of meat quality through application of proteomics / W. Wu, Y. Fu, M. Therkildsen, X.M. Li, R.-T. Dai // Food Reviews International. – 2015. – Vol. 31. – №. 1. – P. 13-28.

132. Yoshimura Y. Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry / Y. Yoshimura, N. Goto-Inoue, T. Moriyama, N. Zaima // Food

chemistry. – 2016. – Vol. 210. – P. 200-211. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.096.

133. Yu T. Y. Cooking-induced protein modifications in meat //Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2017. – Vol. 16. – №. 1. – P. 141-159. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12243

134. Zarkadas C.G. Protein quality and identification of the storage protein subunits of tofu and null soybean genotypes, using amino acid analysis, one-and two-dimensional gel electrophoresis, and tandem mass spectrometry / C.G. Zarkadas, C. Gagnon, V. Poysa, S. Khanizadeh, E.R. Cober, V. Chang, S. Gleddie //Food Research International. – 2007. – Vol. 40. – №. 1. – P. 111-128.

135. Zhang J. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification / J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G.A. Lajoie, B. Ma // Molecular & cellular proteomics. – 2012. – Vol. 11. – №. 4.

136. Zvereva E.A. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products / E.A. Zvereva, L.I. Kovalev, A.V. Ivanov, M.A. Kovaleva, A.V. Zherdev, S.S. Shishkin, A.B. Lisitsyn, I.M. Chernukha, B.B. Dzantiev // Meat science. – 2015. – Vol. 105. – P. 46-52.

137. Ахремко А. Г. Применение метода двумерного электрофореза для оценки состава мясных продуктов на примере модельных фаршей //Все о мясе. – 2019. – №. 3. – С. 46-48.

138. Британская энциклопедия [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 05.02.2021. URL: https://www.merriam-webster.com/

139. ГОСТ 26671-2014 "Продукты переработки фруктов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов". – 2016. - М.: Стандартинформ. – 8 с.

140. ГОСТ 33741-2015. МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ. КОНСЕРВЫ МЯСНЫЕ И МЯСОСОДЕРЖАЩИЕ Методы определения

органолептических показателей, массы нетто и массовой доли составных частей. – 2015. - М.: Стандартинформ. – 16 с.

141. Ковалева М.А. Протеомные технологии в исследованиях белкового состава вареных колбасных изделий / М.А. Ковалева, А.В. Иванов, С.С. Шишкин, Е.В. Хряпова, А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, Н.Л. Вострикова // Все о мясе. – 2012. – №. 2.

142. Федулова Л.В. «Мясные» стереотипы // Все о мясе. – 2018. – № 3. – С. 4-7.

143. Чернуха И.М. Влияние термической обработки на сохранность тканеспецифичных белков сердечной мышцы и аорты *sus scrofa* / И.М. Чернуха, Л.В. Федулова, Е.А. Котенкова, Р.Р. Шишкин, Л.И. Ковалев, Н.Г. Машенцева, Д.Л. Клабукова // Биофармацевтический журнал. – 2016. – Т. 8. – №6. – С. 32-38.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ
«ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН
_____ Кузнецова О.А.
«18» декабря 2021 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по анализу результатов одно- и двумерных электрофореграмм

РАЗРАБОТАНО

Зав. Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения
Л.В. Федулова

Мл. науч. сотрудник Экспериментальной Клиники- лаборатории биологически активных веществ животного происхождения
А.Г. Ахремко

Ст. лаборант Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения
М.А. Арюзина

Москва, 2021

УДК 543.545

Федулова Л.В., Ахремко А.Г., М.А. Арюзина

Методические рекомендации по анализу результатов одно- и двумерных электрофореграмм. Москва, 2021. 27с. с илл.

В методических рекомендациях представлены теоретические основы электрофоретического разделения белков и дальнейшая интерпретация полученных результатов после проведения одно- и двумерного электрофореза, используя информационные ресурсы.

Методические рекомендации предназначены для научных сотрудников НИИ и ВУЗов, студентов и аспирантов, широкого круга исследователей в качестве руководства для анализа полученных электрофореграмм.

Одобрено на заседании Ученого совета

ПРЕДИСЛОВИЕ

В ситуации интенсификации производства пищевых продуктов, качество сырья имеет важное значение для промышленности, при этом качество и органолептические показатели являются наиболее важными признаками для потребителей. На эти признаки оказывает влияние генетика, факторы окружающей среды, условия содержания и дальнейшая обработка. По-прежнему вызывает интерес молекулярные механизмы, лежащие в основе данных процессов. Однако, генетическая информация остается постоянной в течение жизни организма, в то время как белковый состав довольно динамичен и меняется в зависимости от факторов, влияющих на синтез или деградацию белка. Таким образом, изучение протеома, экспрессируемого из генома в текущих условиях окружающей среды/переработки дает возможность прогнозировать интересующие свойства изучаемого образца белковой природы.

На сегодняшний день инструментарий протеомики значительно усовершенствован, очень стремительно развиваются масс-спектрометрические методы. Большинство протеомных методов основаны на разделении белков по меньшей мере в двух направлениях, с использованием хроматографических или электрофоретических методов, с дальнейшей идентификацией методами масс-спектрометрии. В данной работе внимание направлено на электрофоретические методы, поскольку они до сих пор являются отличным способом визуализации белковой составляющей и широко используются в различных областях науки, с акцентом на биоинформационный анализ.

Целью предлагаемых методических рекомендация является показать возможности и перспективы анализа и обработки, полученных электрофореграмм.

В данном руководстве представлены материалы по анализу и обработке одно- и двумерных электрофореграмм с использованием информационных ресурсов, собранные и успешно применяемые в Экспериментальной Клинике-лаборатории биологически активных веществ ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН на протяжении более 3-х лет.

Содержание:

1. Методы электрофоретического разделения белков 87
1.1. Одномерный электрофорез 87
1.2. Двумерный электрофорез 88
2. Интерпретация полученных электрофореграмм 91
2.1. Анализ одномерных электрофореграмм 91
2.2. Анализ одномерных электрофореграмм при помощи программного комплекса imagej94
2.3. анализ двумерных электрофореграмм 105
список используемой литературы 109

МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Для количественной и качественной характеристики белковой составляющей продукта применяются различные методы. Электрофоретический метод позволяет определить фракционный состав белков животного и растительного происхождения, по которому можно (1) прогнозировать функционально-технологические свойства; (2) выявить влияние технологической обработки на сохранность и свойства белков; (3) идентифицировать видо- и тканеспецифические белки, и т.д. Однако именно идентификация белкового состава сырья является весьма важным аспектом, поскольку позволяет напрямую определить качественный состав готового продукта [1].

Электрофорезом называют движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофоретический метод в биохимии – это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле.

Результатом проведения электрофореза является *электрофореграмма* - картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления.

1.1 ОДНОМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) является широко используемым методом для разделения белковых смесей по молекулярной массе, основанным на взаимодействии белков с анионным детергентом, додецилсульфатом натрия (ДСН, или лаурилсульфат натрия) с образованием отрицательно заряженных комплексов. Когда ДСН связан с белком, общий заряд молекулы примерно пропорционален его размеру [2], поэтому электрофоретическая подвижность белков становится пропорциональной их молекулярной массе и не зависит от конформационных изменений и заряда белка.

Процедура SDS-PAGE

Перед началом электрофореза белковую смесь преинкубируют в присутствии додецилсульфата натрия (SDS, ДСН, лаурилсульфат натрия). Анионный детергент (поверхностно-активное вещество) SDS прочно связывается с большинством белков в соотношении 1,4 мг ДСН / 1 мг белка, при этом суммарный комплекс белок-(SDS)n приобретает отрицательный заряд, кроме того SDS приводит к разрушению нековалентных связей, приводя к денатурации белков. Дополнительная обработка белков реагентами, восстанавливающих дисульфидные связи, такие как 2-меркаптоэтанол или дитиотреитол (ДТТ), приводит к дальнейшей денатурации белков и разрушению белков - белковых комплексов (рис. 1) [3].

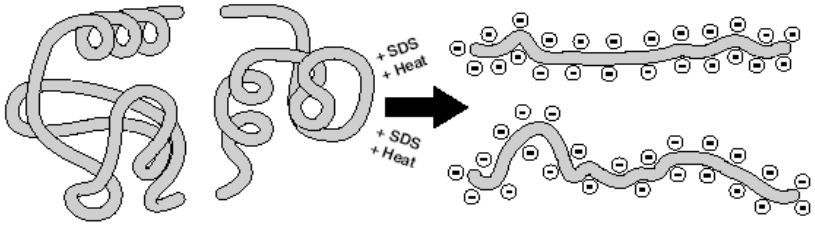


Рисунок 1 – Действие SDS на структуру белка

В этом случае единственным фактором, который может повлиять на подвижность белков в полиакриламидном геле является размер белка, а точнее его молекулярная масса. Подвижность белков-(SDS)n обратно пропорционально логарифму молекулярной массы: низкомолекулярные комплексы движутся быстрее, чем высокомолекулярные. Это означает, что молекулярная масса белков может быть определена по относительной подвижности белка в геле, а наличие одной полосы в таком геле может являться хорошим критерием чистоты препарата [3, 4, 5].

Одномерный электрофорез в основном проводят на полиакриламидных гелях (ПААГ, рис. 2). Разделяющие свойства ПААГ определяются трехмерной сетью волокон и пор, которая сформирована за счет бифункциональных бисакриламидных связей между смежными полиакриламидными цепями. Полимеризация катализируется системой, производящей свободные радикалы, составленной из инициатора аммония персульфата (ПСА) и катализатора тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) [6]. Следовательно, полиакриламидный гель, используемый для электрофореза, представляет собой смесь двух веществ — акриламида (АА) и метилен-бис-акриламида (МБА).

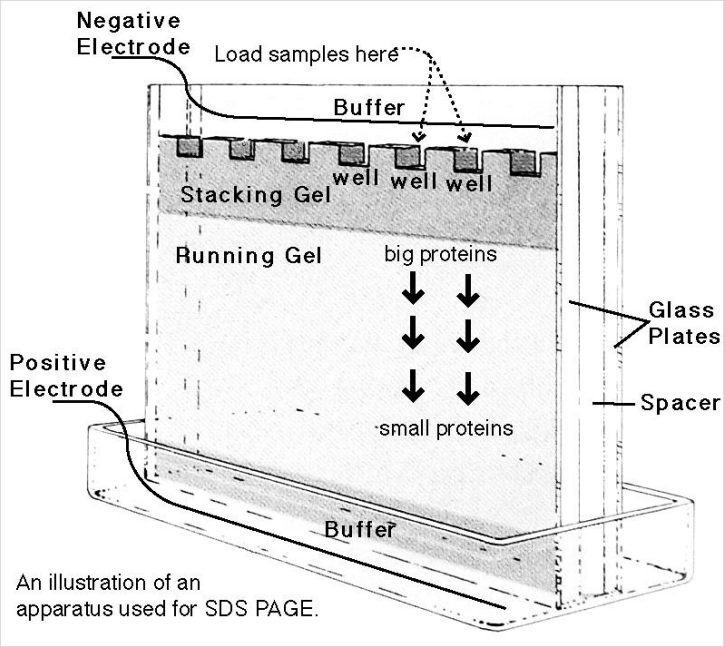


Рисунок 2 – Принцип метода SDS-PAGE

С увеличением концентрации акриламида в геле эффективный размер пор уменьшается. Эффективный размер пор геля определяет его разделяющие свойства, то есть сопротивление геля к перемещению макромолекул. Регулируя размер пор геля путем изменения концентрации акриламида, можно оптимизировать разрешающую способность метода для конкретного анализируемого образца, например, для мясных продуктов это 12,5 %-ный полиакриламидный гель.

1.2 ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Двумерный электрофорез (two-dimensional electrophoresis, 2DE, 2ДЭФ) - вариант метода электрофореза, в котором сочетаются изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) и электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия. Двумерный электрофорез

предложен Патриком О'Фарреллом в 1975 г. и используется для разделения сложных смесей белков [7].

Для каждого белка существует такое значение pH среды (обозначаемое как pI – изоэлектрическая точка, рис. 3), при котором положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, поэтому заряд всей белковой молекулы равен нулю. Из-за разницы в аминокислотном составе разные белки имеют отличные значения pI. При pH ≠ pI молекулы белка приобретают заряд и под действием электрического поля перемещаются к противоположно заряженному электроду - катоду (-) или аноду (+). При осуществлении ИЭФ создают градиент pH, в котором белки мигрируют в область, где значение pH эквивалентно изоэлектрической точке. После попадания белков в зону pH, соответствующую значению их изоэлектрических точек, движение белков в электрическом поле прекращается, и они накапливаются (фокусируются) в этой зоне. Следовательно, в результате ИЭФ происходит разделение белков в первом направлении согласно их изоэлектрической точке [8].

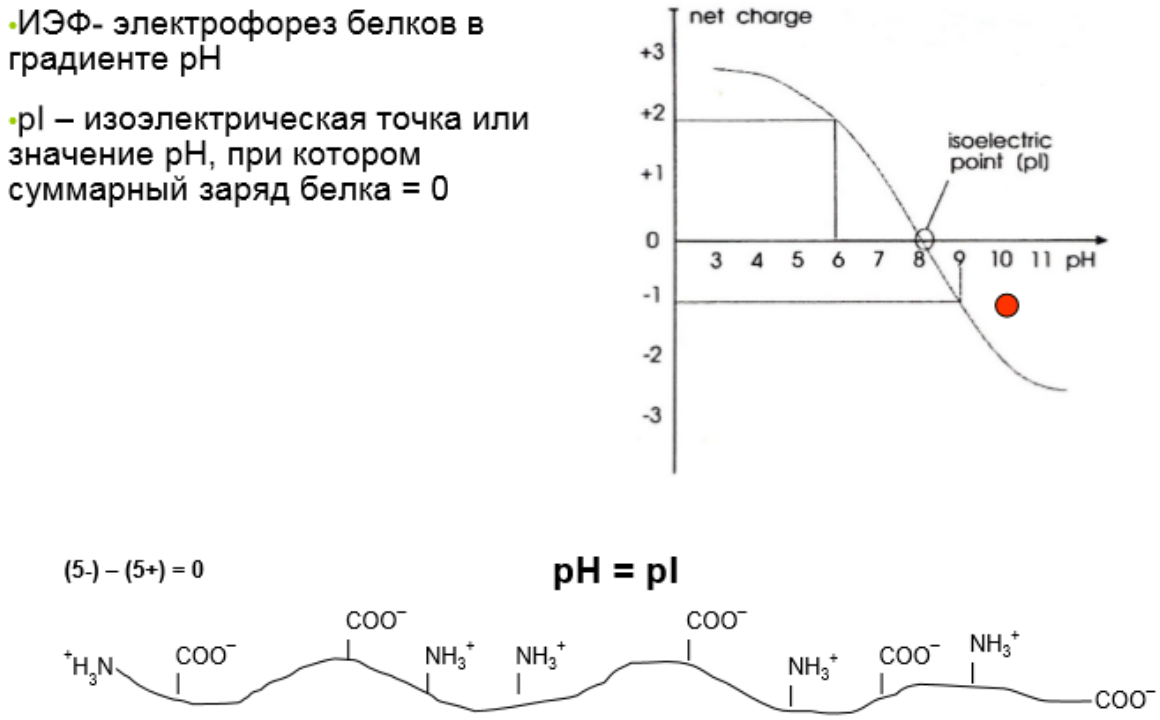


Рисунок 3 – Схематическое изображение изоэлектрической точки

Первая стадия 2Д-электрофореза белков – изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) проводится в присутствии мочевины и неионного детергента (тритон Х-100, нонидет Р-40). В результате изоэлектрического фокусирования белки электрофоретически разделяются в градиенте pH, созданного амфолинами (сложная смесь амфотерных соединений) (рис. 4).

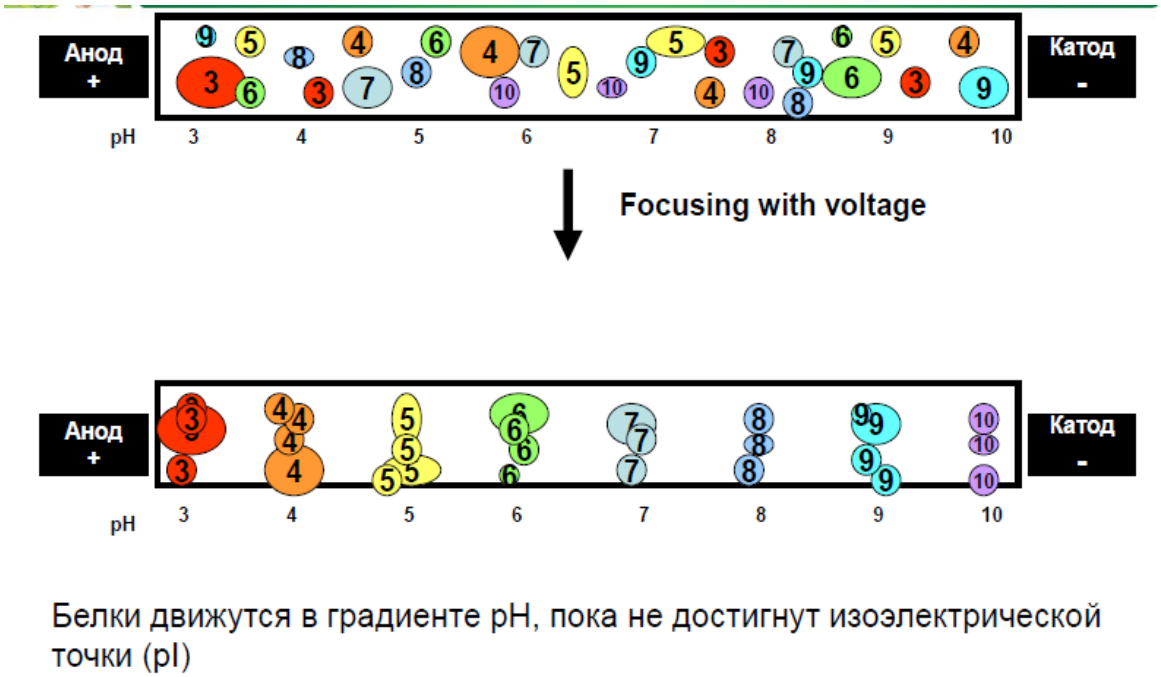


Рисунок 4 – Принцип ИЭФ

После окончания процедуры изоэлектрического фокусирования белки, находящиеся в полоске с pH-градиентом, подвергают процедуре уравновешивания с анионным детергентом додецисульфатом натрия (ДСН). В результате этой процедуры белки денатурируются и приобретают отрицательный заряд. Затем переходят ко второй стадии 2ДЭФ. Полоски с белками после завершения ИЭФ используют в дальнейшем в качестве стартовой зоны, от которой начинают фракционирование во втором направлении – электрофорез на пластине ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 5). Для

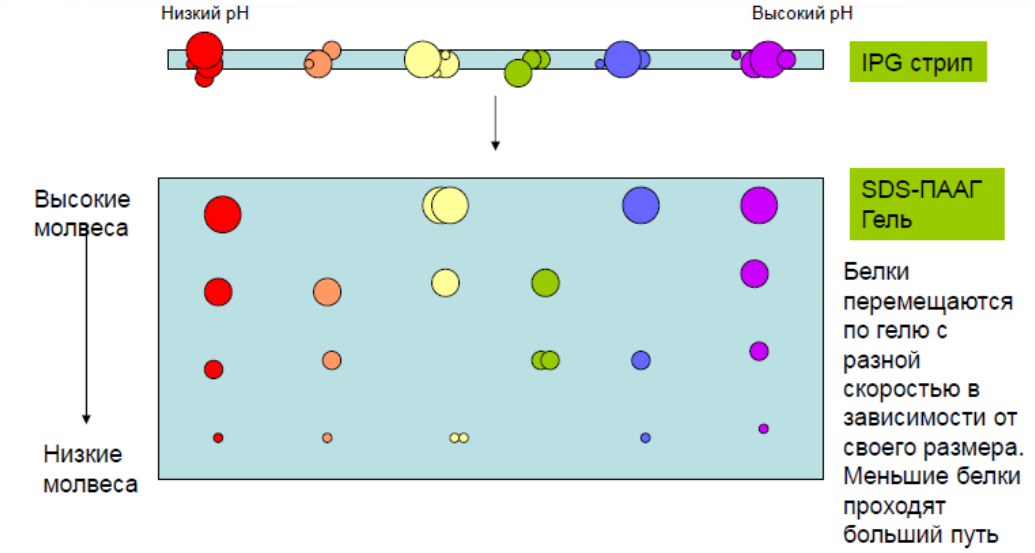


Рисунок 5 – Схема фракционирования белков во втором направлении 2ДЭФ

этого, полосы, содержащие белки в гелевом градиенте pH, помещают поверх пластины ДСН ПААГ и заливают для фиксации агарозой. Комплексированные с ДСН белки покидают гель с градиентом pH, в котором произошло их разделение в первом направлении, и переходят в ДСН ПААГ, где затем они разделяются во втором направлении. К пластине геля через электроды подают постоянный электрический ток. Заряженные отрицательно белки под действием

электрического тока движутся к аноду и разделяются в соответствии с их размерами (радиусом Стокса). В результате проведения 2ДЭФ в геле хорошо разрешаются пятна белков с молекулярными массами от 10 до 250 кДа и значениями изоэлектрических точек от 3,8 до 8. (Спектр значений изоэлектрических точек локализуется в интервале pH 3 – 13.) Белки с молекулярной массой выше 250 кДа трудно или вообще нельзя анализировать методом 2Д-электрофореза.

2. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

2.1 АНАЛИЗ ОДНОМЕРНЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

В результате проведения 1D-ЭФ получают одномерную электрофореграмму (1ЭФ) рис.6.

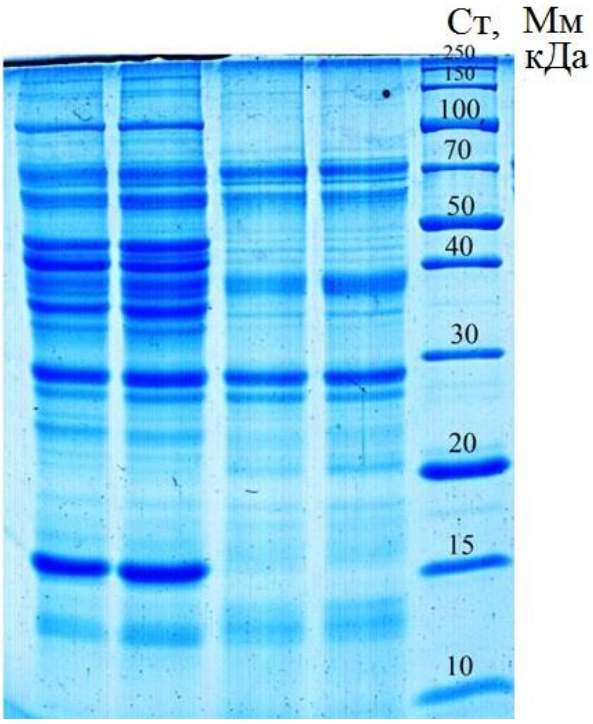


Рисунок 6 – Электрофореграмма образца сырокопченой колбасы (свинина и говядина)

Для обработки полученной электрофореграммы, изначально считают количество полос для каждого образца, описывают их интенсивность окрашивания (мажорные, минорные, ярко-выраженные, слабо выделяющиеся) в различных диапазонах молекулярных масс [9].

Справа указаны стандарты молекулярных масс белковых фракций. С их помощью можно оценить молекулярную массу (Мм) исследуемого образца. Таким образом, если интересует масса конкретного белка, то проводится горизонтальная линия в сторону стандартов и визуально определяется масса белковой фракции (рис. 7). В данном случае Мм белковой полосы составляет приблизительно 38 кДа (38 000 Да). Для более точного значения строится калибровочная кривая [3].

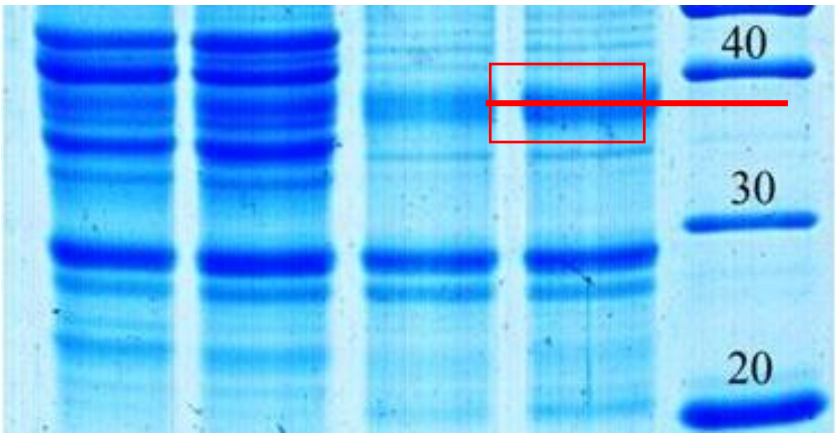


Рисунок 7 – Определение Мм на 1Д-электрофореграмме

При анализе одномерных электрофореграмм часто используемых видов мясного сырья (свинина, говядина, курица), можно предположить наличие конкретных белковых соединений при помощи базы данных UniProt Protein data base [10].

Для этого нужно зайти на сайт https://www.uniprot.org/ и нажать на БД Swiss-Prot (рис. 8), в которой можно найти белки, которые аннотируются в ручную специалистами и являются достоверными.

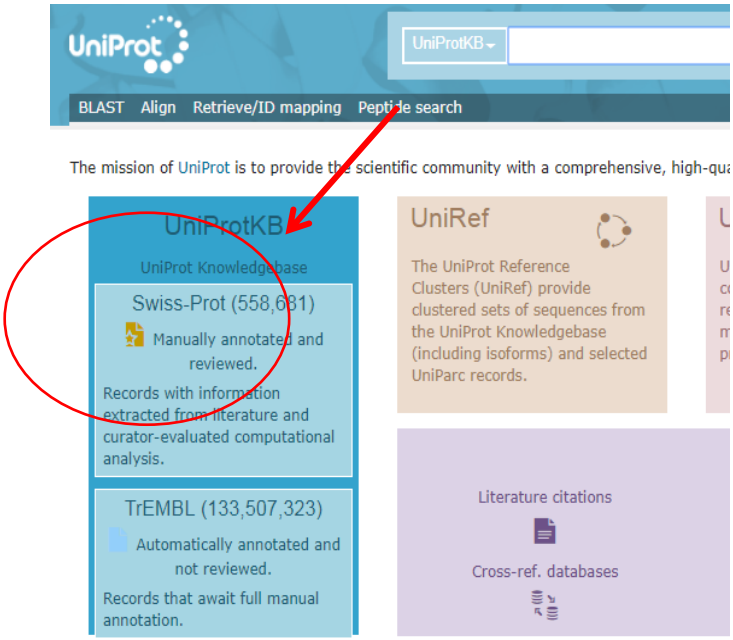


Рисунок 8 – Выбор БД Swiss-Prot

Далее необходимо нажать на «Columns» для того, чтобы выбрать колонку с Мм, поставив галочку у «Mass» и удалить галочку около параметра «Length» (рис. 9,10).

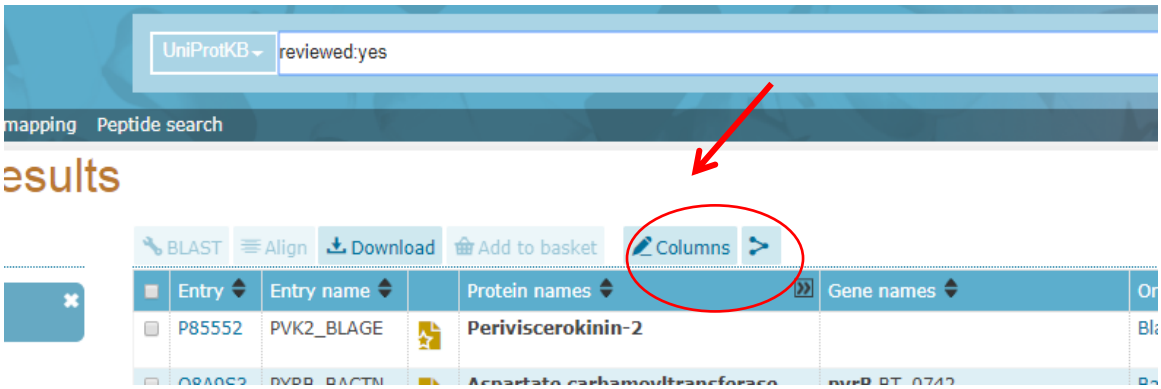


Рисунок 9 - Выбор параметра «Columns»

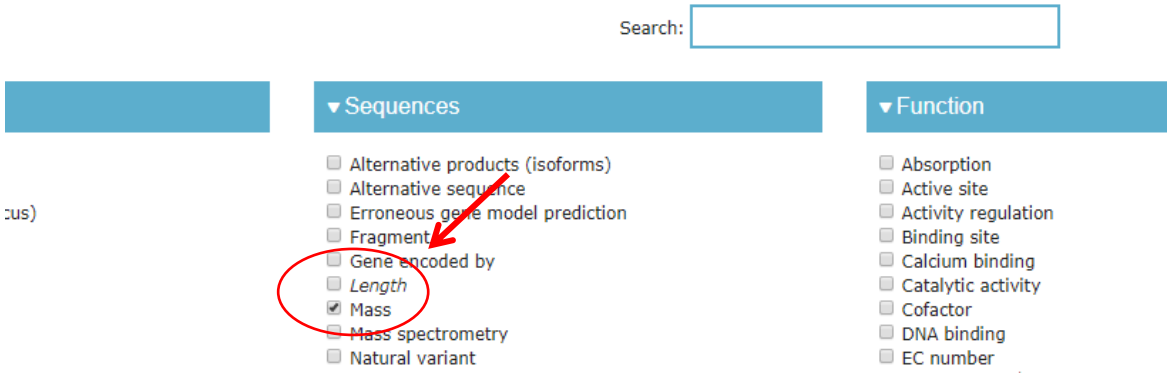


Рисунок 10 - Выбор параметра «Mass»

Далее нажимаем в правом верхнем углу пункт «Save» для сохранения выбранных параметров (рис. 11).

Рисунок 11 – Сохранение выбранных параметров

Тем самым справа появилась колонка с молекулярными массами белков в дальтонах (Да). Далее, необходимо выбрать интересующий вид мышечной ткани на латинском, например, свиньи (лат. *Sus scrofa*) (рис.12).

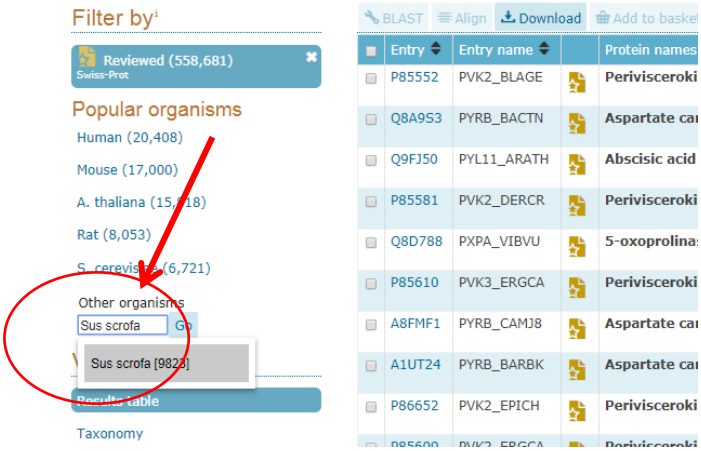


Рисунок 12 - Выбор вида мышечной ткани в БД «UniProt Proteindatabase»

Затем вписываем в строку поиска мышечные белки на английском «muscle protein» и нажимаем «Search» справа (рис. 13). Если интересует какой-то конкретный орган или ткань, то соответственно, пишется его название на английском языке

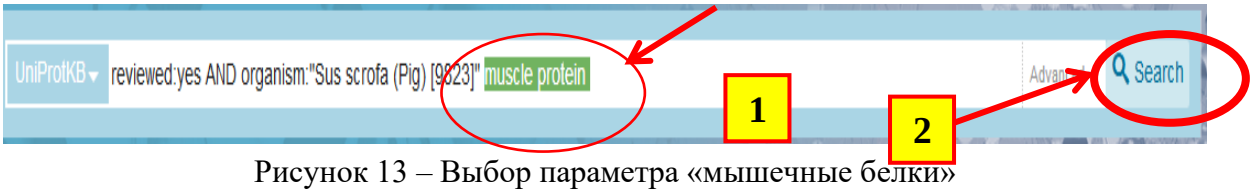


Рисунок 13 – Выбор параметра «мышечные белки»

После того, как выбран организм и мышечные белки, отображается список белков соответствующих, в данном случае, *Sus scrofa* (свинье). В колонке с молекулярными массами

выбираем стрелочку вверх (вниз) для сортировки их от больших к меньшим (или наоборот) (п.1, рис.14) и получаем список белков начиная с самой максимальной Мм. В данном списке ищем интересующий белок с Мм 38 000 Да, прокручивая вниз колесо мыши. Если на первой страничке не оказалось нужного белка, как в данном случае, то нажимаем на стрелочку вправо, которая перелистнёт на следующую (п.2, рис. 14).

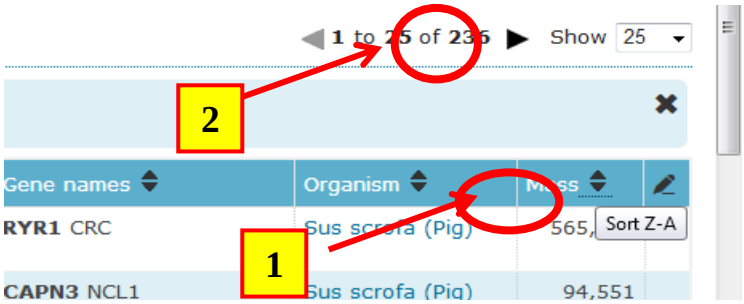


Рисунок 14 – Сортировка молекулярных масс по увеличению или убыванию

Таким образом, на пятой страничке (101-125) находим нужное нам значение или максимально приближенное к нему (рис. 15).

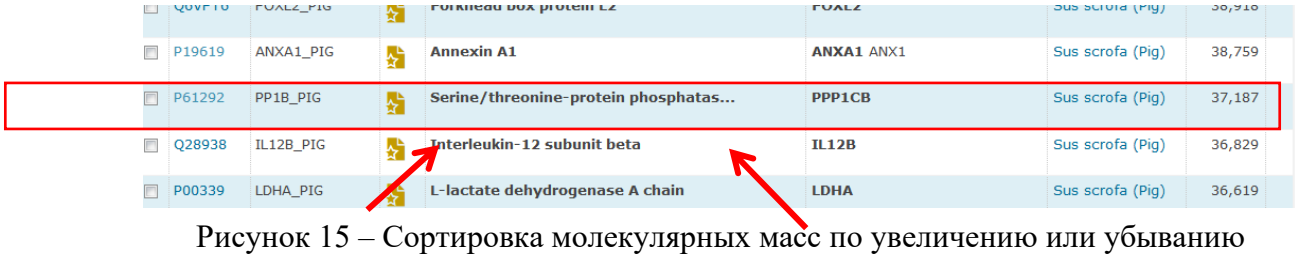


Рисунок 15 – Сортировка молекулярных масс по увеличению или убыванию

В конкретном случае, это белок катепсин К с молекулярной массой 37 187 Да (37,187 кДа). Затем можно посмотреть подробную информацию о данном белке перейдя по активной ссылке слева «P61292» от выбранного белка (рис.16).

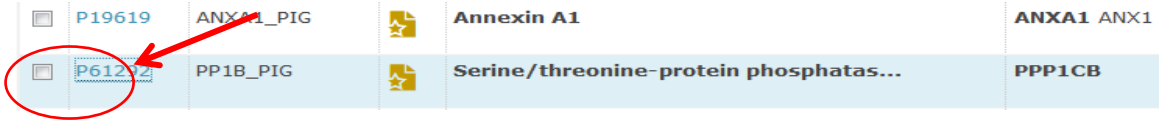


Рисунок 16 – Просмотр более подробной информации о необходимом белке

Откроется окно, в котором можно найти такие данные по белку, как его функция, активность, кофактор, роль в молекулярных и биологических процессах и др.

2.2. АНАЛИЗ ОДНОМЕРНЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ ПРИ ПОМОЩИ ПРОГРАММНОГО КОМПЛЕКСА IMAGEJ

Для анализа одномерных электрофореграмм используется программный комплекс ImageJ, представляющий собой графический редактор, который позволяет анализировать, обрабатывать, сохранять и печатать 8-битные, 16-битные и 32-битные изображения. Комплекс может читать многие форматы файлов, такие как TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS. В ImageJ можно вычислять площади, статистические показатели пиксельных значений различных выделенных областей интереса на изображениях и многое другое. Комплекс оснащен возможностью создавать гистограммы плотности и рисовать профили линий, позволяет производить различные геометрические преобразования, такие как масштабирование, поворот или отражение. Ниже

представлен алгоритм для определения относительного процентного содержания белка в образце.

Данную программу можно скачать на официальном сайте [11], перейдя в раздел «Download» (рис. 17). Для этого следует выбрать ссылку на скачивание для Windows (рис. 18).

Рисунок 17 – Главная страница сайта ImageJ с выделенным разделом «Download»

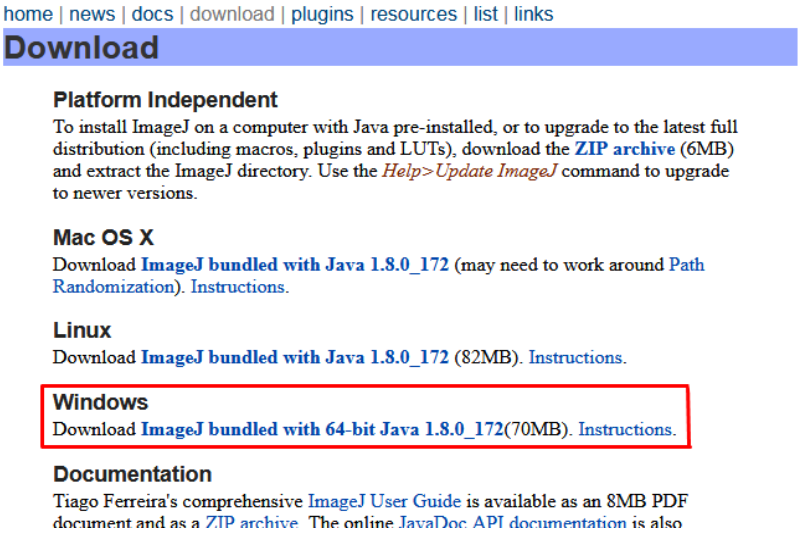


Рисунок 18 – Раздел «Download»

Далее необходимо сохранить файл в желаемой папке, нажав кнопку «ОК» (см. рис. 19, 20). После скачивания файл отображается в формате zip, поэтому его требуется разархивировать, используя любую программу для открытия zip-файлов. В данном случае извлечение проводится с помощью 7-Zip File Manager: нажать кнопку «Извлечь», затем выбрать папку для перемещения и нажать «ОК» (рис. 21).

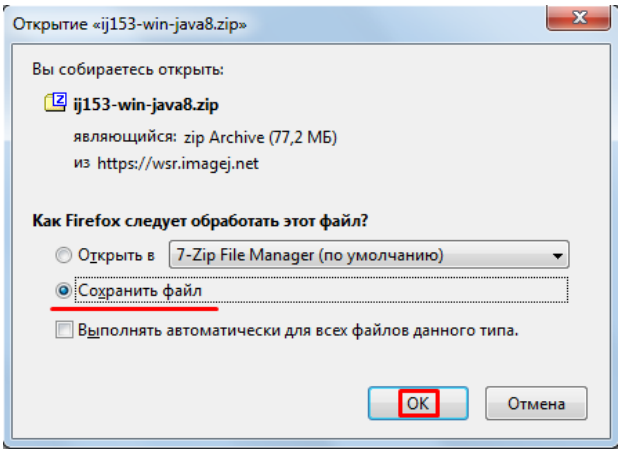


Рисунок 19 – Выбор варианта открытия файла

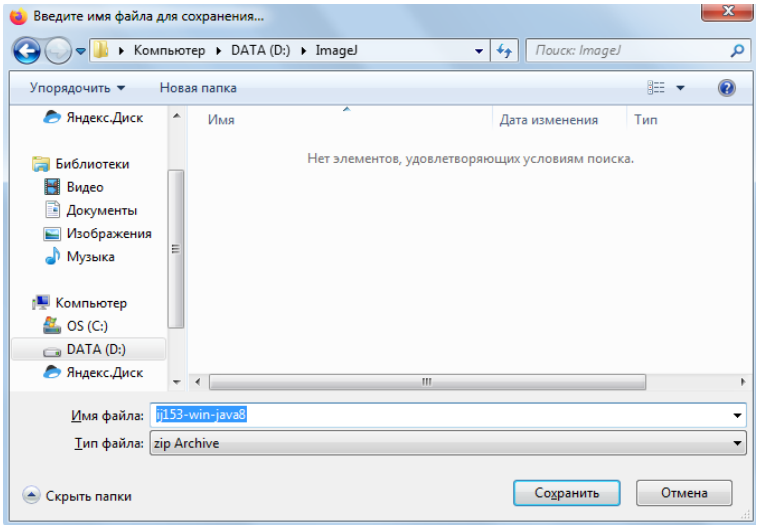


Рисунок 20 – Выбор папки для сохранения файла

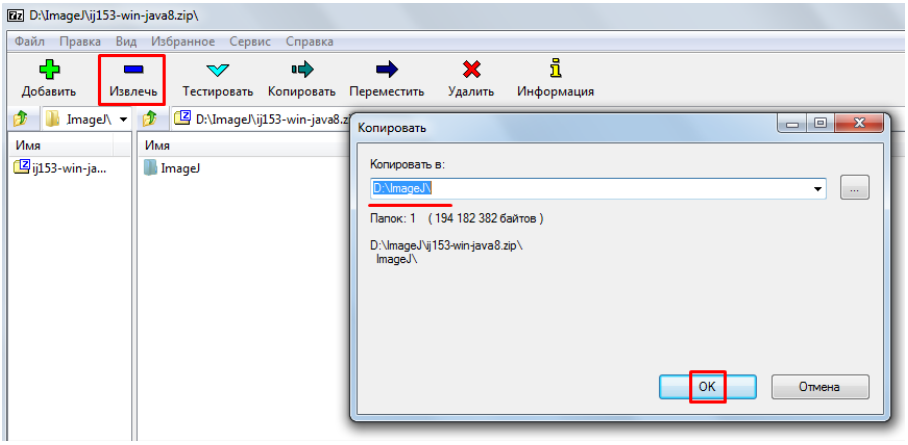


Рисунок 21 – Процесс извлечения файла из архива

В вышеупомянутой папке требуется найти программу ImageJ (рис. 22). При её запуске появляется окно, изображенное на рисунке 23. Для открытия файла в программе следует нажать на кнопку «File», затем на «Open» (рис. 24) (или можно использовать горячие клавиши «Ctrl+O»), далее появляется окно, в котором выбирается нужный файл.

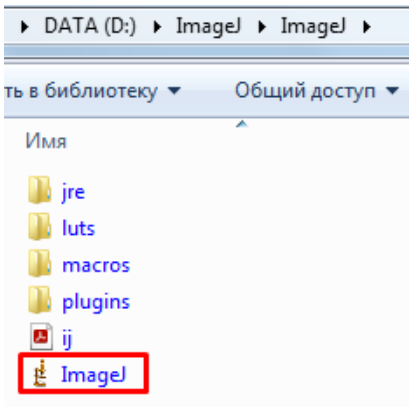


Рисунок 22 – Программный комплекс ImageJ в папке

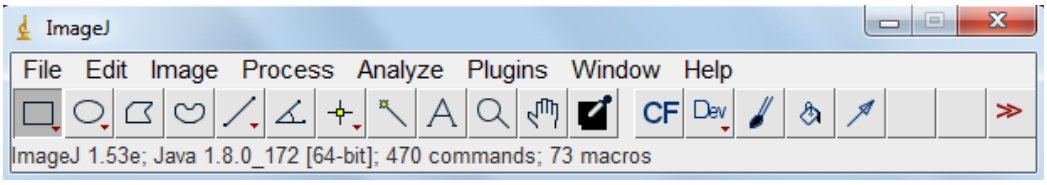


Рисунок 23 – Стартовое окно ImageJ

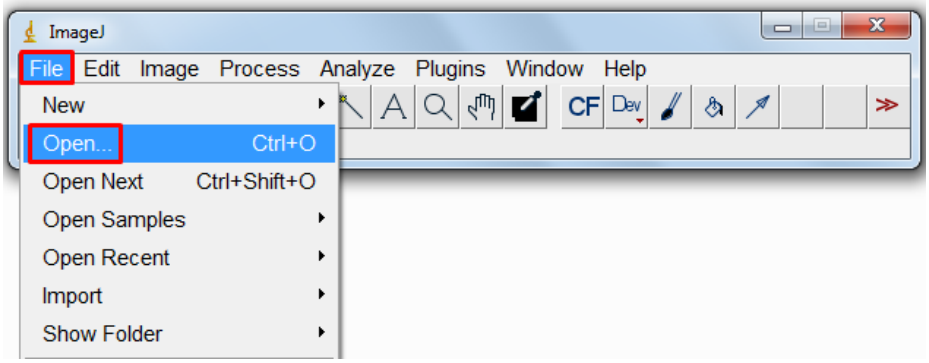


Рисунок 24 – Открытие файла в ImageJ

Изображение открывается в отдельном окне (рис. 25). Для построения графиков плотности геля необходимо выбрать выделение прямоугольной области (см. рис. 26). Отметить нужную полосу геля (вертикальную), как показано на рисунке 27. Затем зайти в раздел «Analyze», выбрать «Gels» и «Select First Line» или воспользоваться горячими клавишами «Ctrl+1» (см. рис. 28).

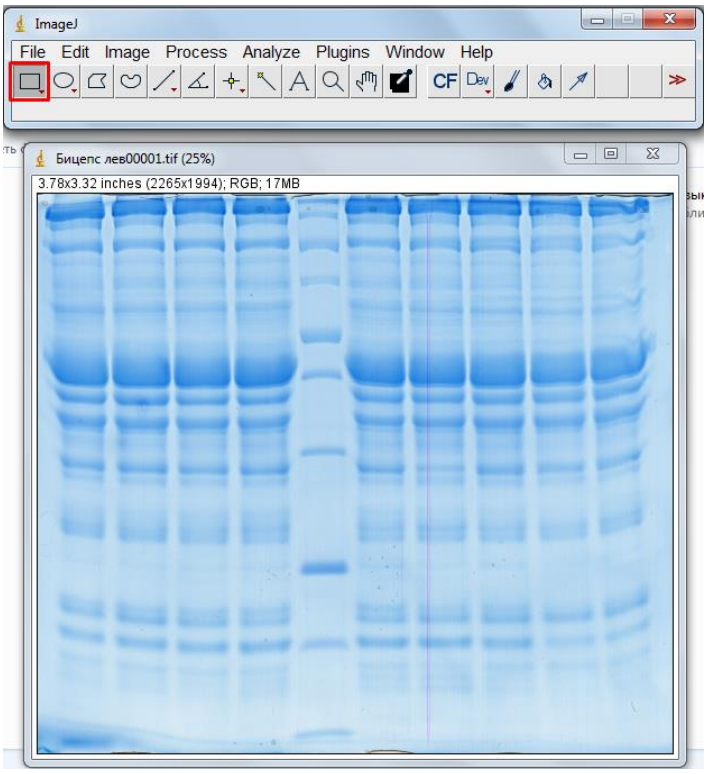


Рисунок 25 – Изображение геля, открытое в отдельном окне

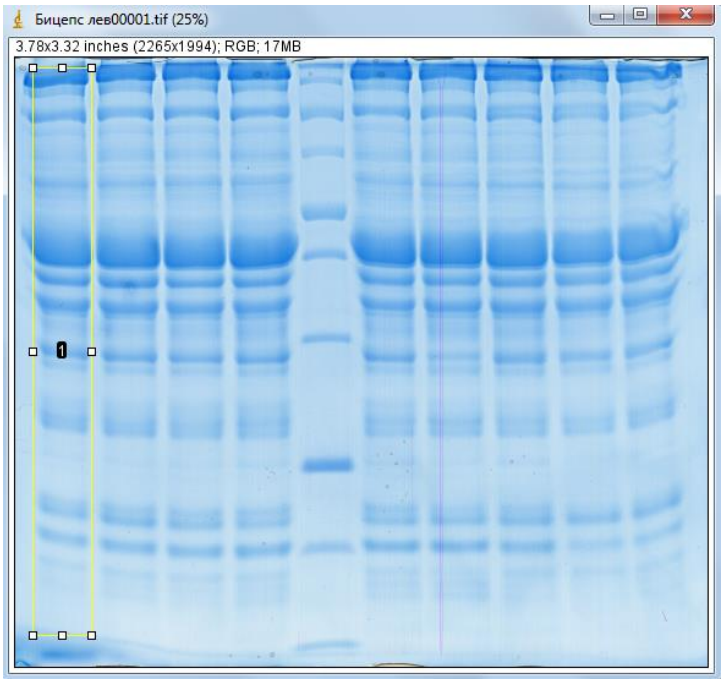


Рисунок 26 – Выделение нужной полосы на геле

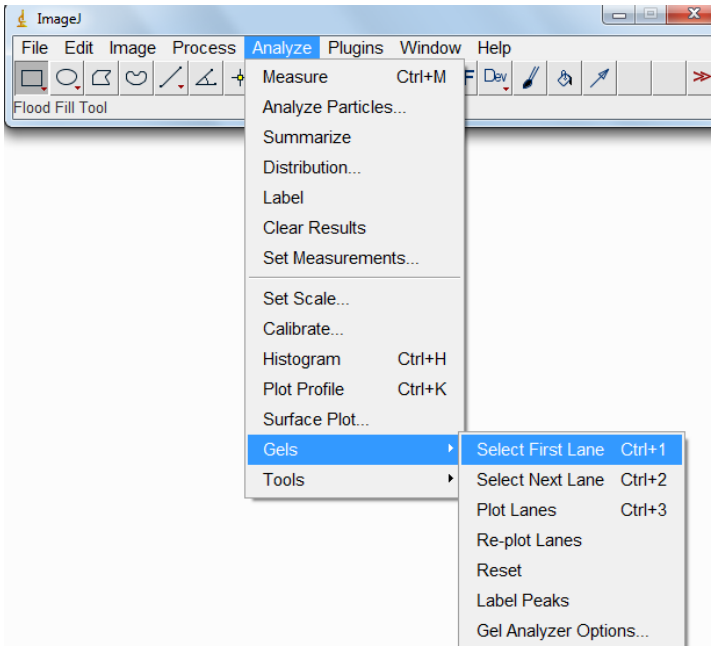


Рисунок 27 – Демонстрация действия выбора первой линии

После этого левой кнопкой мыши зажимается область в желтом прямоугольнике и перемещается на следующую интересующую вертикальную полосу геля, далее в разделе «Analyze» выбирается «Gels» и «Select Next Line» или уместно воспользоваться горячими клавишами «Ctrl+2». Результат представлен на рисунке 28, данное действие (перемещение прямоугольника и сочетание клавиш «Ctrl+2») повторяется, как указано на рисунке 29. Важно, чтобы нумерация полос была строго слева направо.

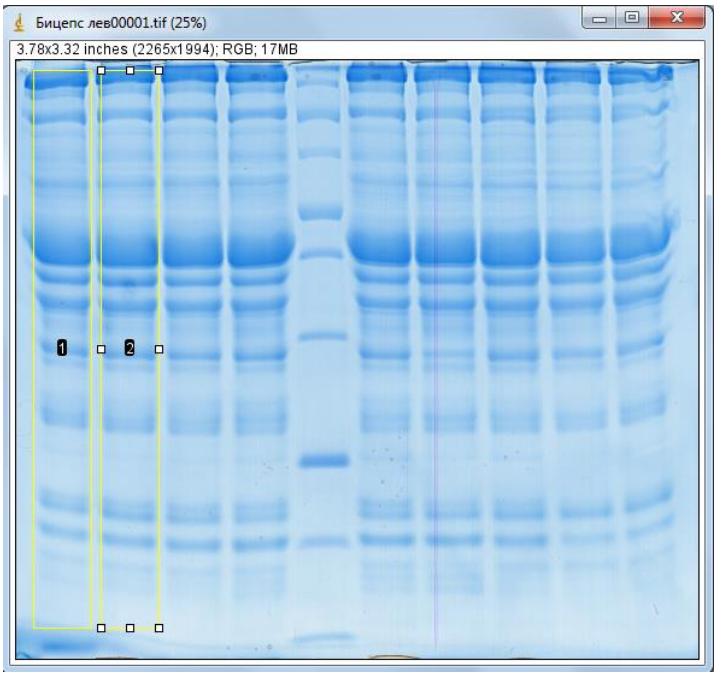


Рисунок 28 – Выделение второй полосы на геле

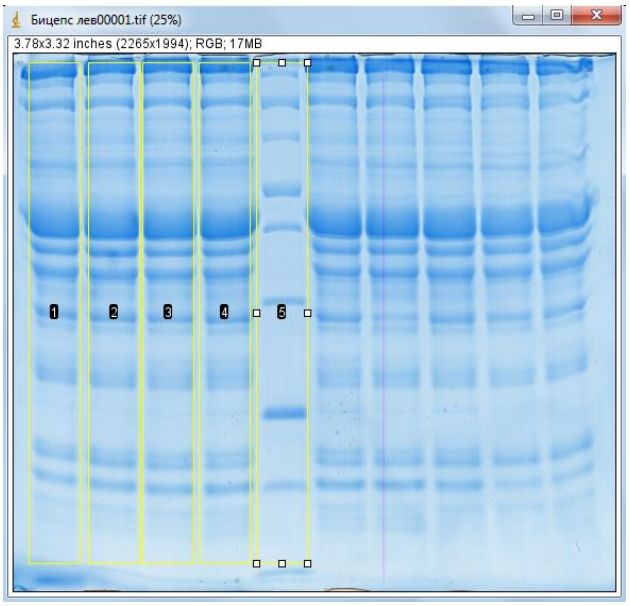


Рисунок 29 – Выделение всех полос на геле

Затем в том же разделе «Analyze», «Gels», выбирается «Plot Lanes» (или клавиши «Ctrl+3»). В открывшемся окне появляются построенные графики для всех выделенных полос (см. рис. 30). Самые высокие пики на графиках – это самые темные области на электрофореграмме (белковые пятна). Можно обозначить отдельную белковую фракцию и посчитать её процентное содержание относительно всех обнаруженных фракций. Для этого необходимо нажать на значок «прямая линия», как показано на рисунке 31 и отграничить чертой все пики (см. рис. 31, 32).

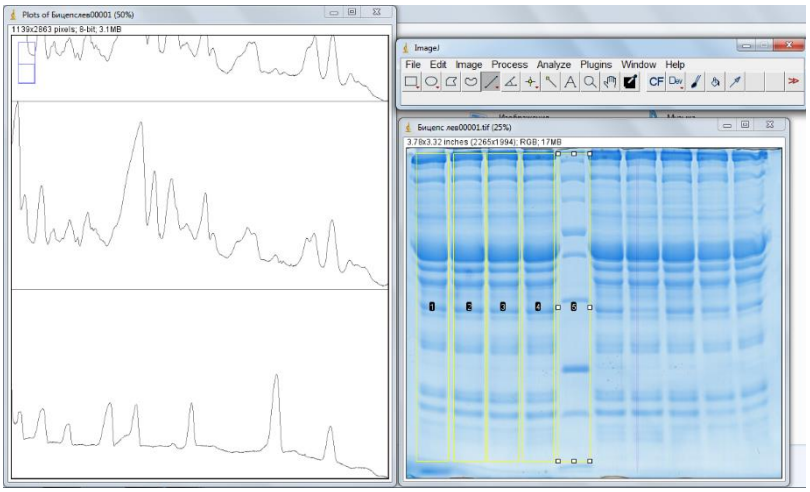


Рисунок 30 – Графики плотности геля (слева) и электрофореграмма с выделенными областями (справа)

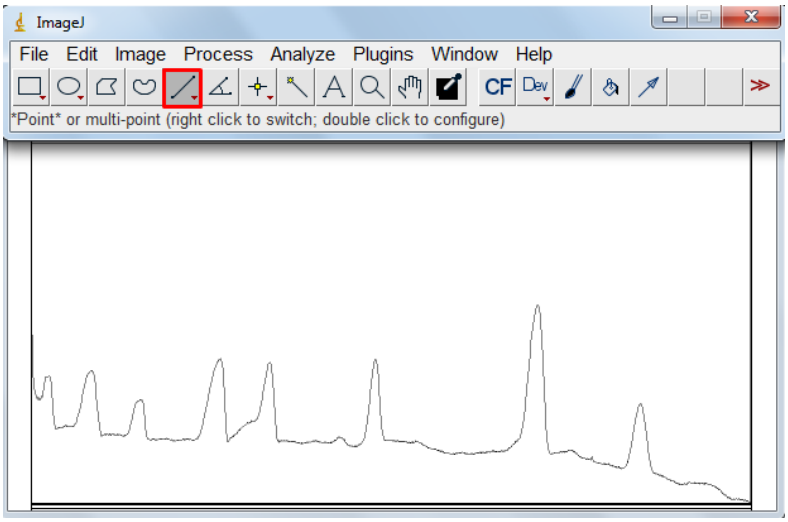


Рисунок 31 – Выбор действия «прямая линия»

Рисунок 32 – Очерчивание пиков на графике

После всего выбирается инструмент «Wand tool» («волшебная палочка»), представленный на рисунке 33. И мышкой наводится в центр первого пика (указано красным крестиком на рис. 34), далее появляется отдельное окно со значением площади отмеченной области в пикселях «Area». Следом по порядку фиксируются остальные пики, в результате чего заполняется таблица со значениями для каждого пика (см. Рисунок . 35).

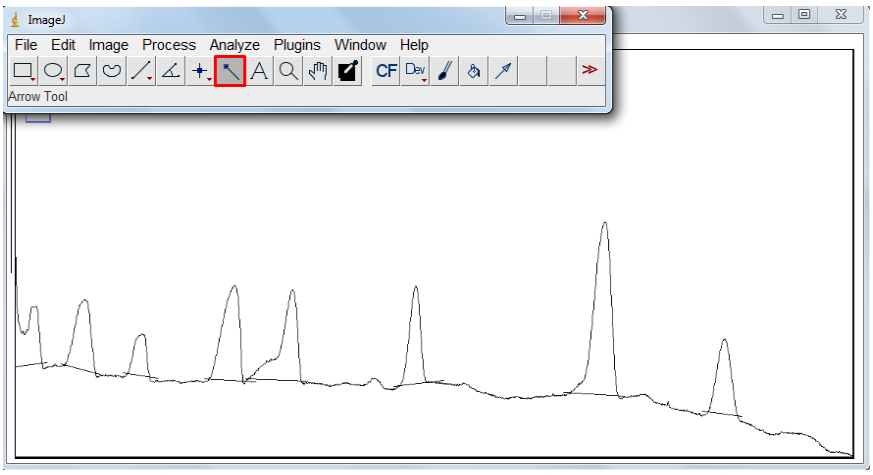


Рисунок 33 – Выбор действия «Wand tool»

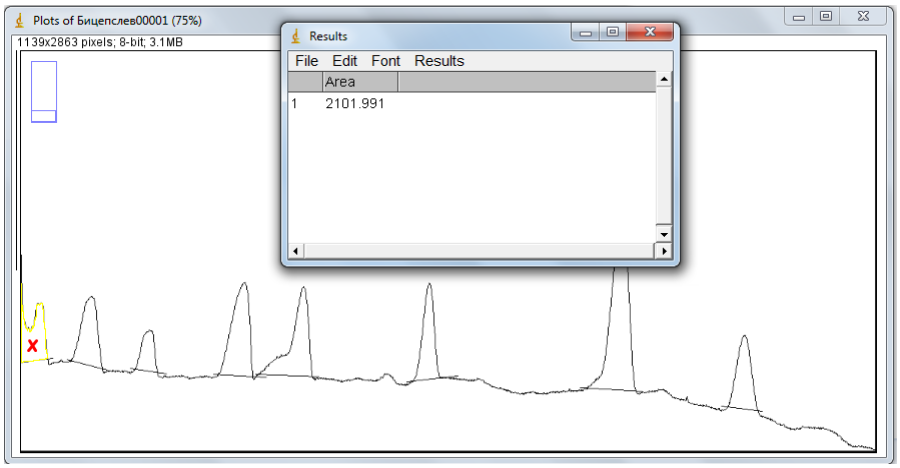


Рисунок 34 – Применение действия «Wand tool»

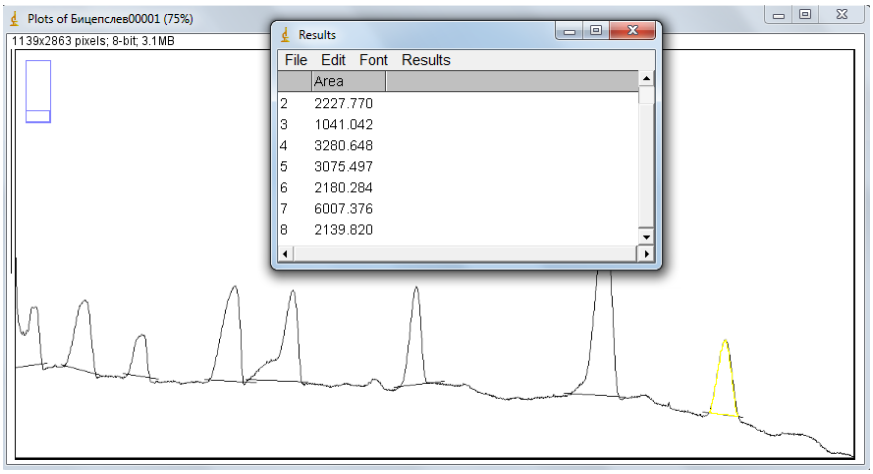


Рисунок 35 – Получение таблицы с результатами

При необходимости можно изменить параметры, которые будут отображаться в таблице, зайдя в раздел «Results», «Set Measurements…» (рис. 36) и в открывшемся окне поставить/убрать нужные галочки и нажать кнопку «ОК» (рис. 37).

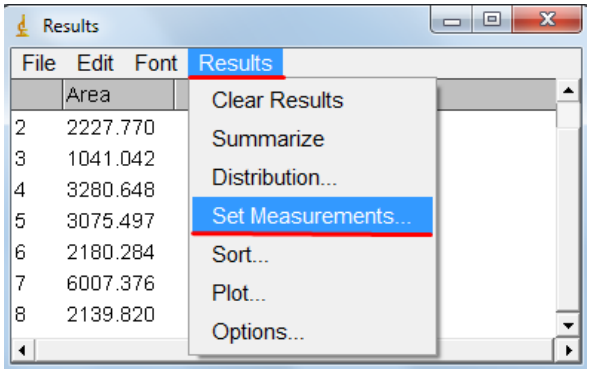


Рисунок 36 – Изменение отображаемых столбцов

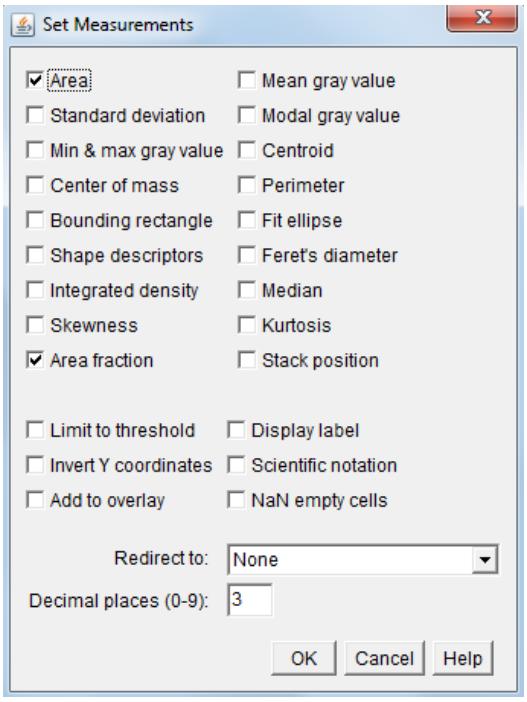


Рисунок 37 – Выбор отображаемых столбцов

Для того, чтобы получить результат в процентном содержании, необходимо в разделе «Analyze», «Gels» выбрать «Label Peaks» (см. рис. 38). Тогда в окне со значениями «Area», появится столбик значений «Percent», продемонстрированный на рисунке 39.

Важное замечание: если выделился лишний/не тот пик с помощью «Wand tool», то при расчете процентов он тоже будет учитываться. Поэтому необходимо обнулить значения, нажав «Label Peaks», затем закрыть окно со значениями и заново воспользоваться функцией «Wand tool». Единственный минус – на графике останутся предыдущие числовые значения.

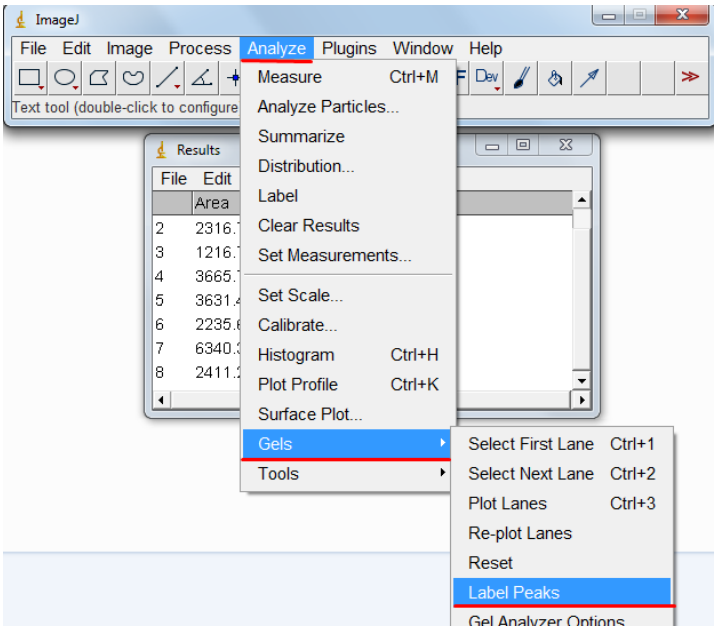


Рисунок 38 – Демонстрация действия «Label Peaks»

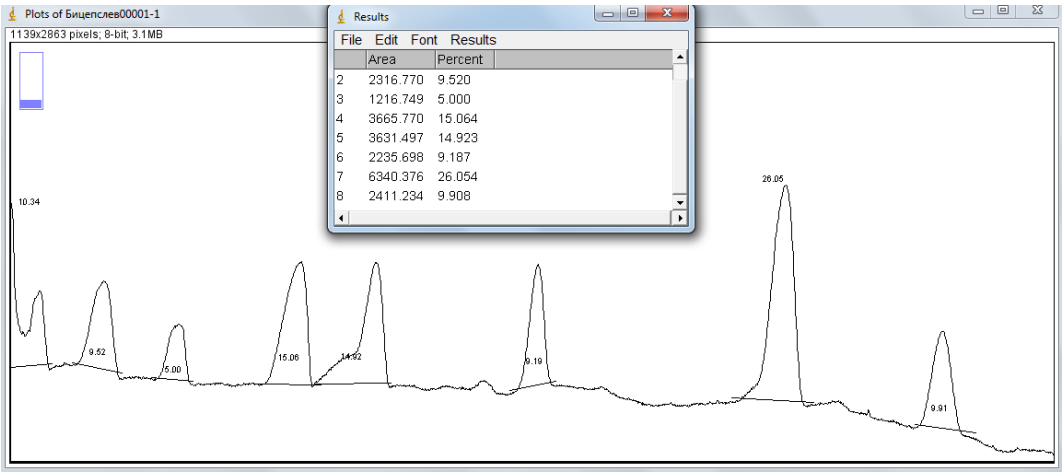


Рисунок 39 – Получение результатов в процентном отношении

На рисунке 40 представлены график и полученные значения для другой полосы геля в качестве ещё одного наглядного примера. При необходимости результаты можно скопировать (для этого нужно нажать «Edit», «Copy», см. рис. 41) и обработать данные в MS Excel или в любой другой программе. Построенный график также можно сохранить, выбрав в разделе «File» кнопку «Save As», как отображено на рисунке 42.

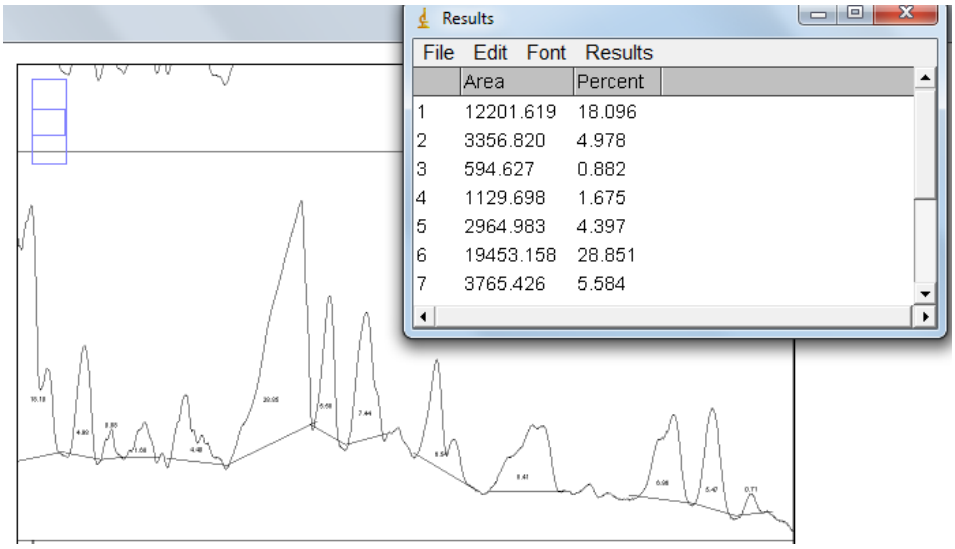


Рисунок 40 – Демонстрация второго полученного графика с результатами

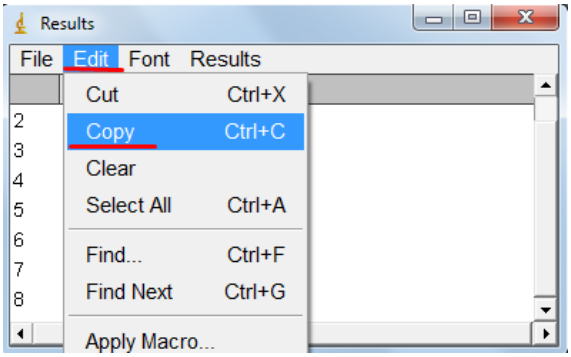


Рисунок 41 – Копирование полученных результатов

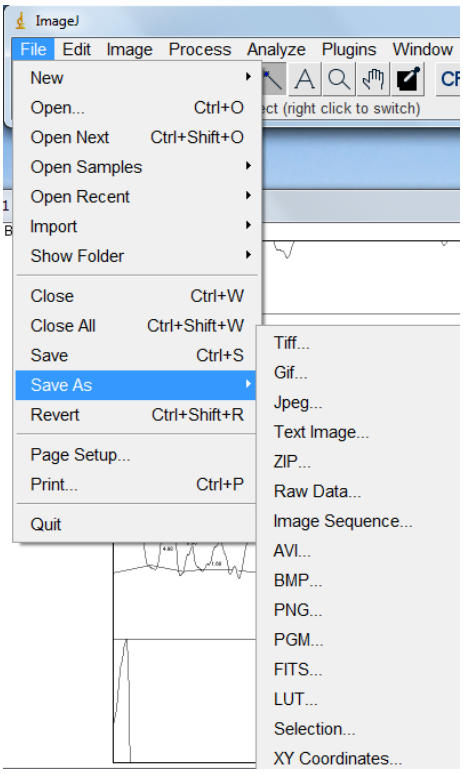


Рисунок 42 – Сохранение файла

Для более подробного изучения данной программы можно обратиться к учебному методическому пособию «Руководство к использованию программного комплекса ImageJ для обработки изображений» [12].

2.3. АНАЛИЗ ДВУМЕРНЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

В результате проведения 2ДЭФ получают двумерную электрофореграмму (2ДЭ) рис.43.

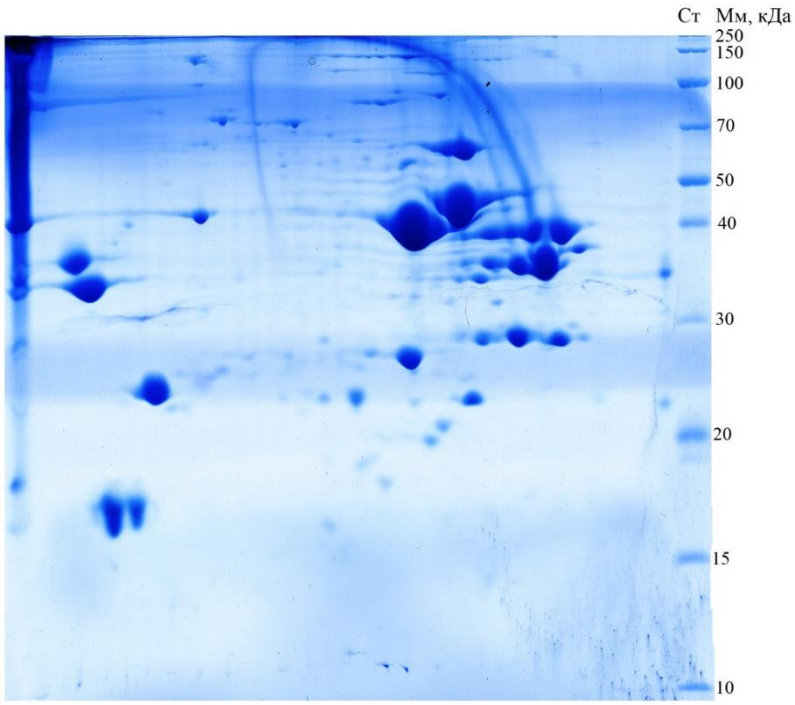


Рисунок 43 – ДЭ образца свинины

Справа указаны стандарты молекулярных масс белковых фракций. С их помощью можно оценить Мм исследуемого образца. Таким образом, если интересует масса конкретного белка, то проводится горизонтальная линия в сторону стандартов и визуально определяется масса белковой фракции (рис.44). В данном случае Мм белкового пятна составляет приблизительно 37 кДа. Для более точного значения строится калибровочная кривая.

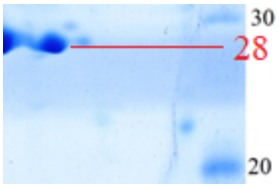


Рисунок 44 – Определение Мм на ДЭ образца свинины

В случае использования протеомных методов для исследования распространенных видов мясного сырья, такого как свинина, говядина, конина, полученные двумерные электрофореграммы, можно интерпретировать при помощи сопоставления белковых пятен с пятнами на протеомных картах отечественной базы данных «Протеомика мышечных органов» [13]. Для этого нужно зайти на сайт http://mp.inbi.ras.ru/, ввести в поле «Логин» и «Пароль» слово «guest» (рис.45) и выполнить вход.

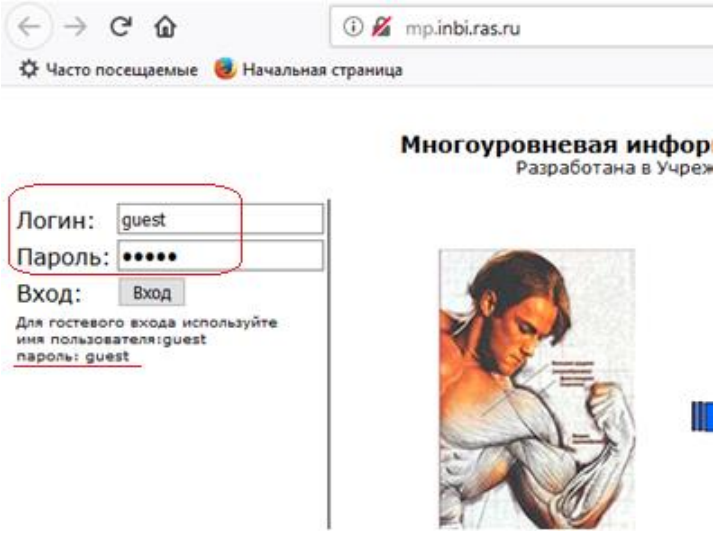


Рисунок 45 – Вход в БД «Протеомика мышечных органов»

Далее, необходимо выбрать интересующий вид мышечной ткани: свиньи, коровы, верблюда или лошади (рис.46).

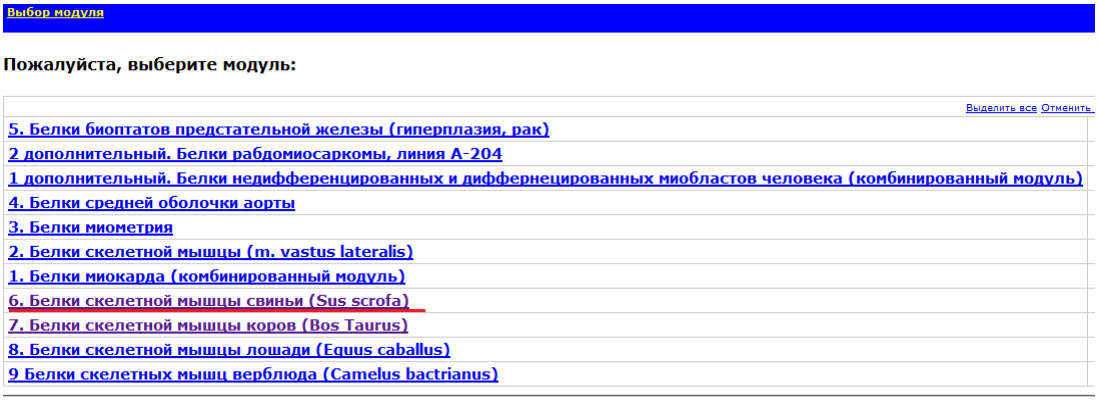


Рисунок 46 – Выбор модуля в БД «Протеомика мышечных органов»

После того, как выбран модуль, отображается протеомная карта скелетной мышцы (рис. 47), при нажатии на белковую фракцию, выводится информация о его названии, молекулярной массе, значении pI и др. (рис. 48).

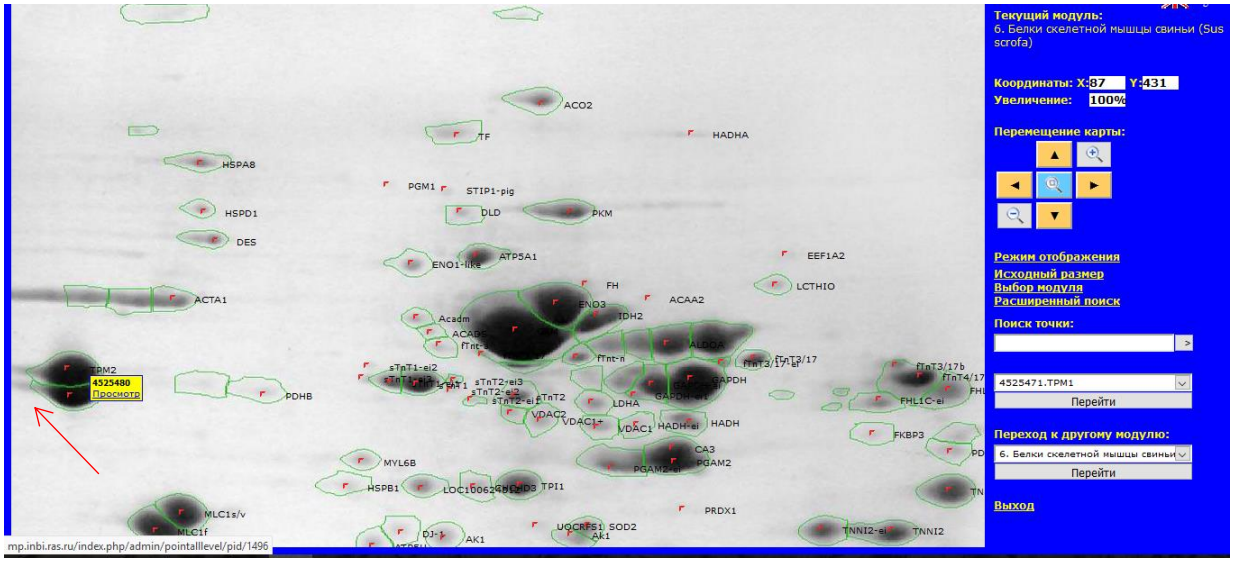


Рисунок 47 – Общий вид модуля скелетной мышцы свиньи

Наименование, номер и координаты белковой фракции

Идентификатор	1496
Наименование	TPM2
Номер	4525480
X	67
Y	427

Белки-аналоги в других модулях

Экспериментальные данные (Уровень 2)

Общие характеристики	
Фракция (Белок)	Тропомиозин β-цепь, tropomyosin beta chain [Sus scrofa]
Локализация на 2ДЭ, номер	4525480
Мм, kDa	33,5
pI (наблюдаемая величина)	4,80
Идентификация	
Метод	Масс-спектрометрия MALDI-TOF MS
Совпадение масс выявленных триптических пептидов с последовательностью белка, %	29
Анализ выявленных триптических пептидов программы Mascot («Matrix Science», США)	

Start	-	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
36	-	48	1645.8300	1644.8227	1644.8141	5.26	1	R.CKQLEEEQQALQK.K
38	-	48	1343.6600	1342.6527	1342.6728	-15.0	0	K.QLEEEQQALQK.K
38	-	49	1471.7700	1470.7627	1470.7678	-3.43	1	K.QLEEEQQALQKK.L
77	-	90	1460.7300	1459.7227	1459.7267	-2.69	1	K.KATDAEADVASLNR.R
78	-	90	1332.6400	1331.6327	1331.6317	0.77	0	K.ATDAEADVASLNR.R
78	-	91	1488.7400	1487.7327	1487.7328	-0.053	1	K.ATDAEADVASLNRR.I
91	-	101	1399.7500	1398.7427	1398.7467	-2.81	1	R.RIQLVEEELDR.A
92	-	101	1243.6500	1242.6427	1242.6456	-2.28	0	R.IQLVEEELDR.A
92	-	105	1727.9000	1726.8927	1726.8849	4.51	1	R.IQLVEEELDRAQER.L
106	-	118	1443.8100	1442.8027	1442.7980	3.27	1	R.LATALQKLEEAEK.A
165	-	171	894.4600	893.4527	893.4606	-8.87	1	K.YEEVARK.L
171	-	181	1298.7700	1297.7627	1297.7605	1.70	1	R.KLVILEGELER.S

Рисунок 48 – Общий вид информации выбранного белка

Далее сопоставляете полученные белки двумерной электрофореграммы с протеомной картой БД «Протеомика мышечных органов» (рис. 49)

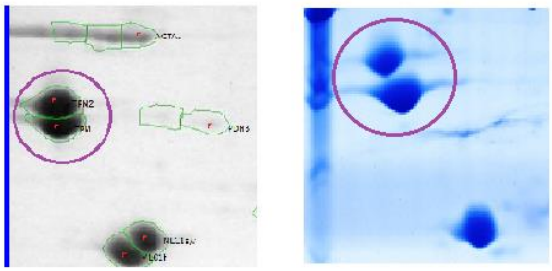


Рисунок 49 – Сопоставление исследуемых белков с протеомной картой БД «Протеомика мышечных органов»

Еще одним вариантом интерпретации полученных 2Д электрофореграмм является сопоставление с работами зарубежных коллег в таких журналах как «Meat Science» и «Proteomics», вводя в строке поиска интересующее сырье. В течение последних двух десятилетий 2DE-карты с идентифицированными фракциями многих видов и тканей животных были опубликованы в журналах, включая карты свиней [14, 15], крупного рогатого скота [16] и курицы [17]. Некоторые из этих карт были использованы для поиска молекулярных маркеров качества мяса, на сегодняшний день подобные работы сохранили свою актуальность в пищевой промышленности.

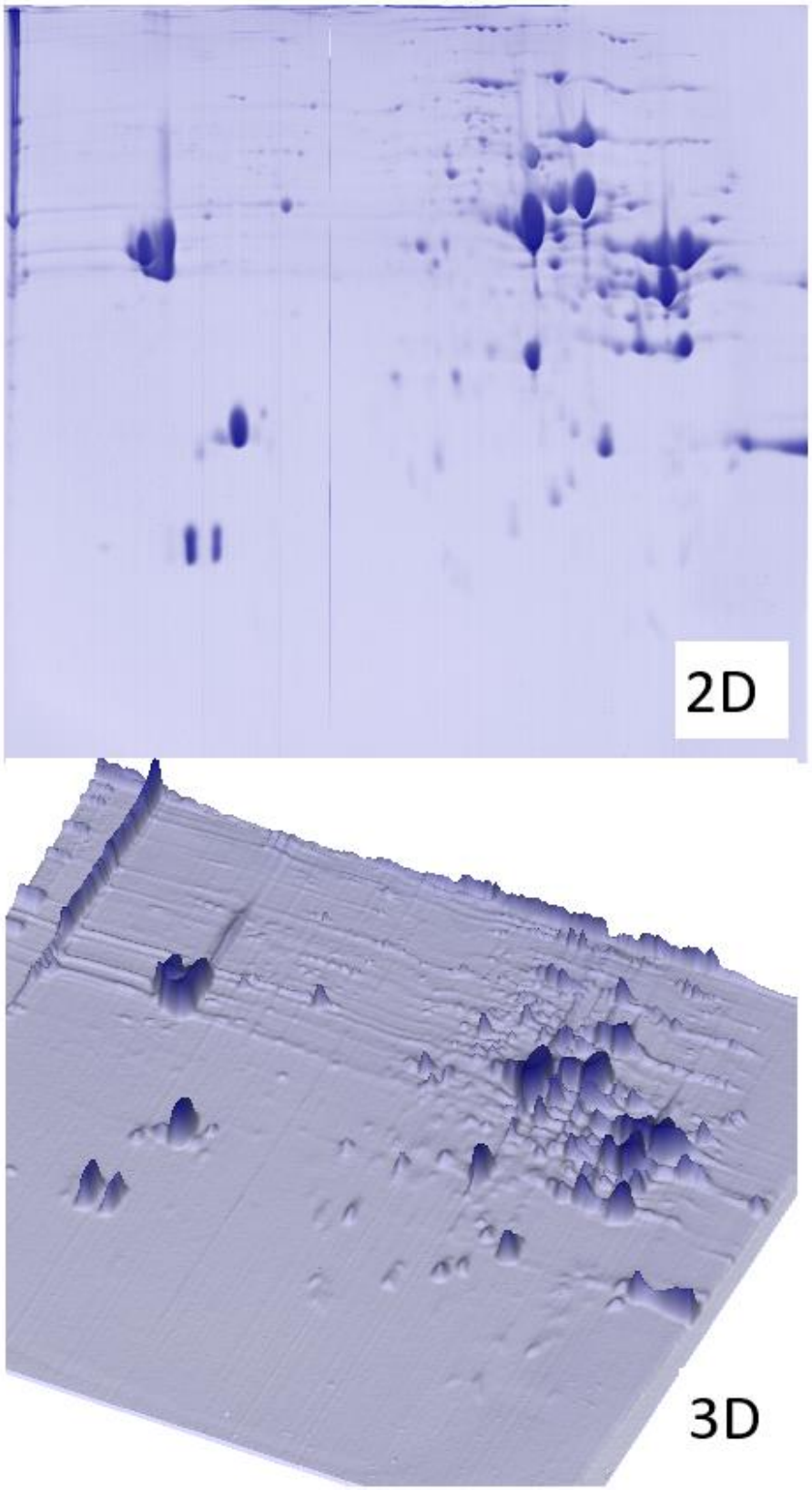
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернуха И.М. Сравнительное изучение автолитических изменений протеома мышечной ткани свинины и говядины // И.М. Чернуха, А.Г. Ахремко / Теория и практика переработки мяса. – 2018. – № 3(3). – С. 56-63. https://doi.org/10.21323/2414-438X-2018-3-3-56-63»
2. Ахремко А.Г. Оптимизация пробоподготовки мясных продуктов для SDS-PAGE. X Международная конференция молодых ученых и специалистов ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова», 27 октября 2016 г. – С. 25-28.
3. Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоритические и практические основы проведения электрофореза белков в полиамидном геле. // Нижний Новгород: Нижегородский университет, 2012, С. 6-17.
4. Сорокина И.А., Вечканов Е.М. Большой лабораторный практикум по биохимии. Часть 2. Биохимия белков и пептидов. Учеб- метод, пособие для вузов // Ростов-на-Дону: Изд-во: «КОПИ-ЦЕНТР», Ростов-на-Дону, 2010, 96 С.
5. Ninfa A. J., Ballou D. P., Benore M. Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology. – Bethesda, MD : Fitzgerald Science Press, 1998. – P. 247-271.
6. Rath A. et al. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106. – №. 6. – P. 1760-1765.
7. O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins //Journal of biological chemistry. – 1975. – Vol. 250. – №. 10. – P. 4007-4021.
8. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) // М.: Наука, 1981, С. 288.
9. Чернуха И.М. Оптимизация электрофоретических исследований в полиакриламидном геле для мясных компонентов на примере Bos Grunniens // И.М. Чернуха, Л.В. Федулова, А.Г. Ахремко / Актуальная биотехнология. - 2016. - №3 (18). - С. 149-153.
10. UniProt Protein data base [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.uniprot.org/.
11. Официальный сайт программы ImageJ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://imagej.nih.gov/ij/ (дата обращения 02.02.2021г.)
12. Конюхов А.Л. Руководство к использованию программного комплекса ImageJ для обработки изображений: Учебное методическое пособие. – Томск: кафедра ТУ, ТУСУР, 2012. –105 с. http://tu.tusur.ru/upload/posobia/ImageJ.pdf
13. База данных «Протеомика мышечных органов» [Электронный ресурс http://mp.inbi.ras.ru Дата обращения 30.10.2018 г]
14. Lametsch R., Roepstorff P., Bendixen E. Identification of protein degradation during postmortem storage of pig meat // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – Vol. 50. – № 20. P. 5508–5512.
15. Morzel M. et al. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures // Meat Science. – 2004. – Vol. 67. – № 4. – P. 689–696.
16. Bouley J., Chambon C., Picard B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry //Proteomics. – 2004. – Vol. 4. – №. 6. – P. 1811-1824.
17. Doherty M. K. et al. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain //Proteomics. – 2004. – Vol. 4. – №. 7. – P. 2082-2093.

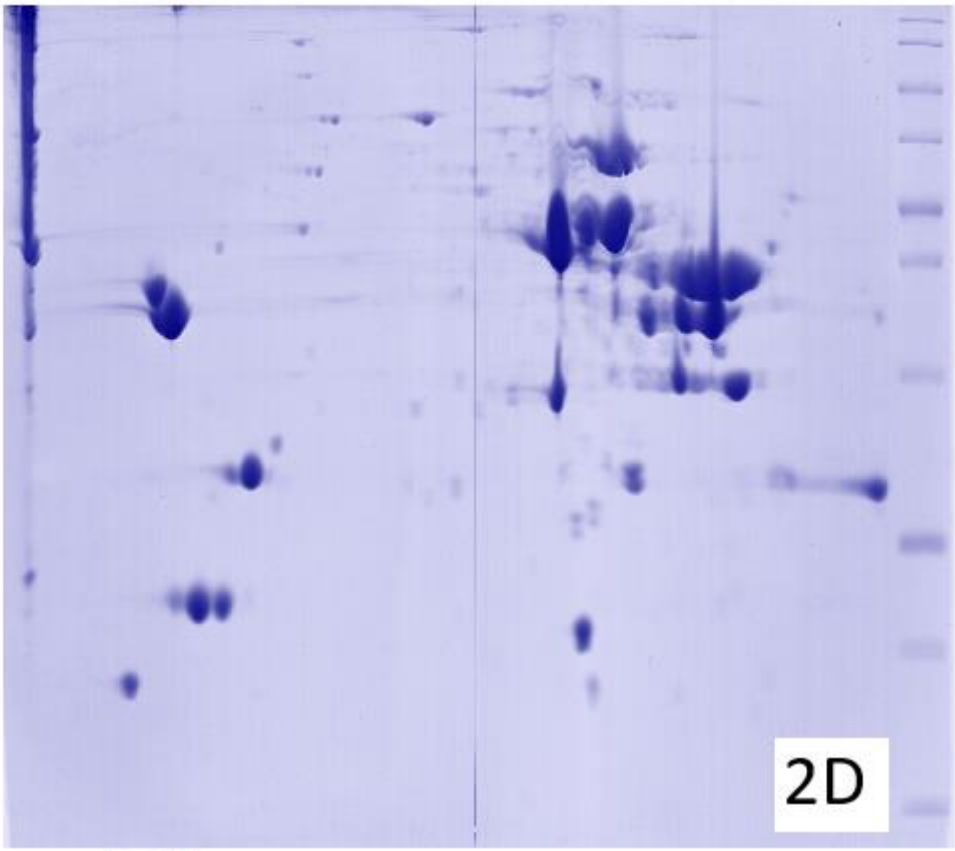
Приложение 2

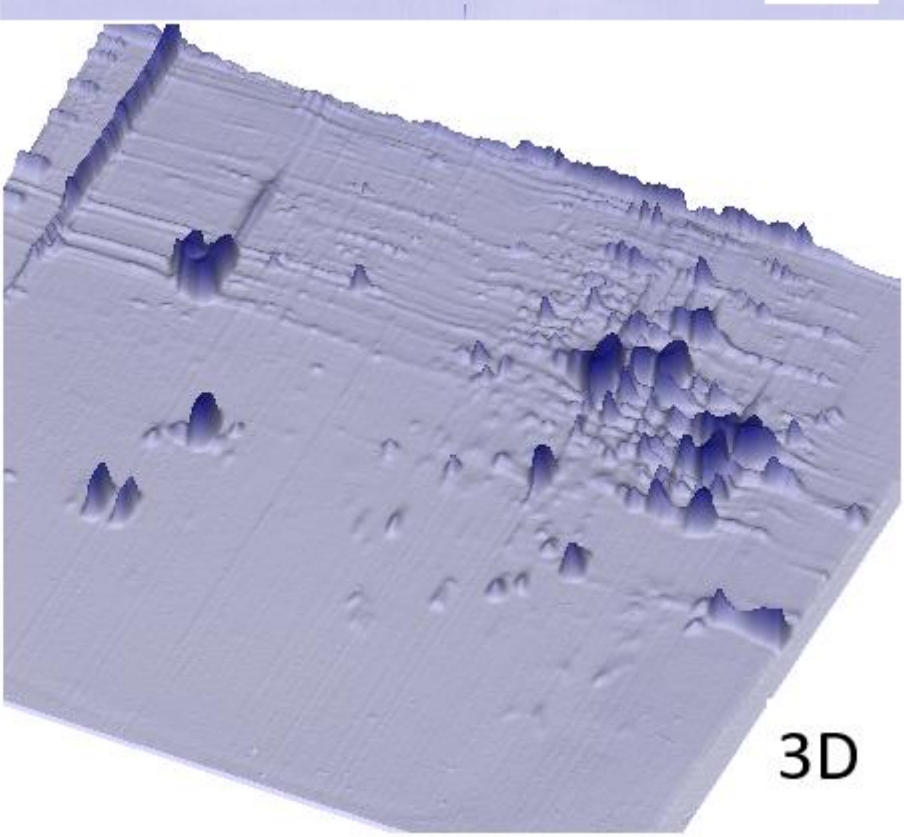
Протеомные карты мышечных тканей свиней

***l. dorsi* поросят**

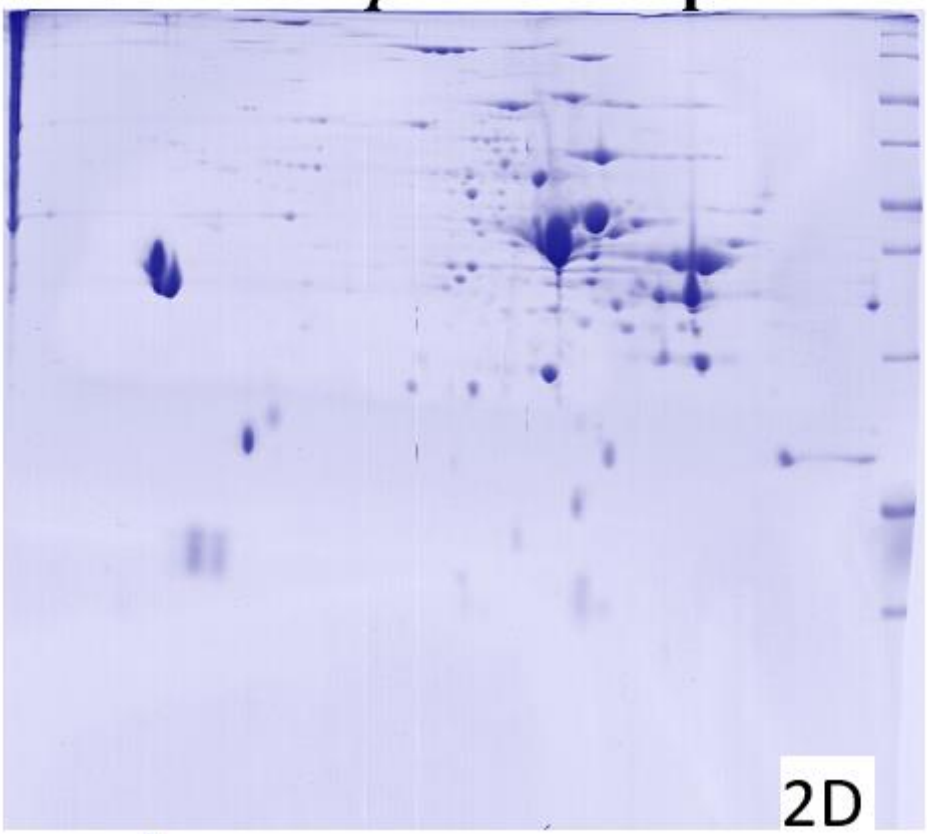


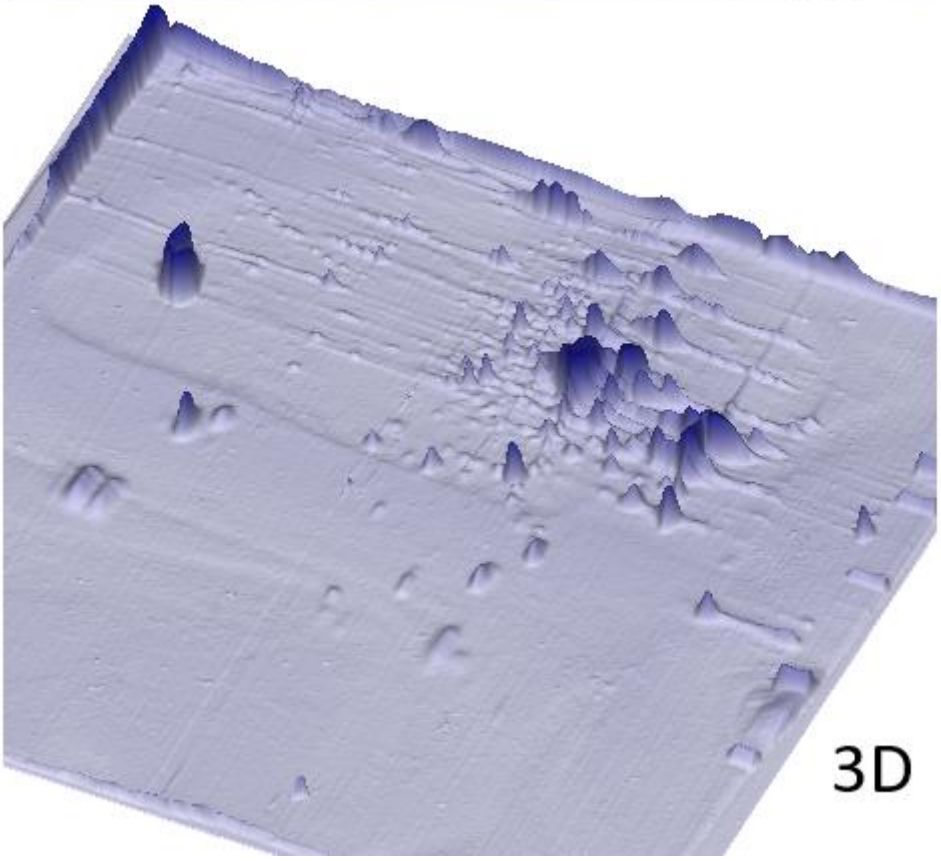
l. dorsi половозрелых свиней



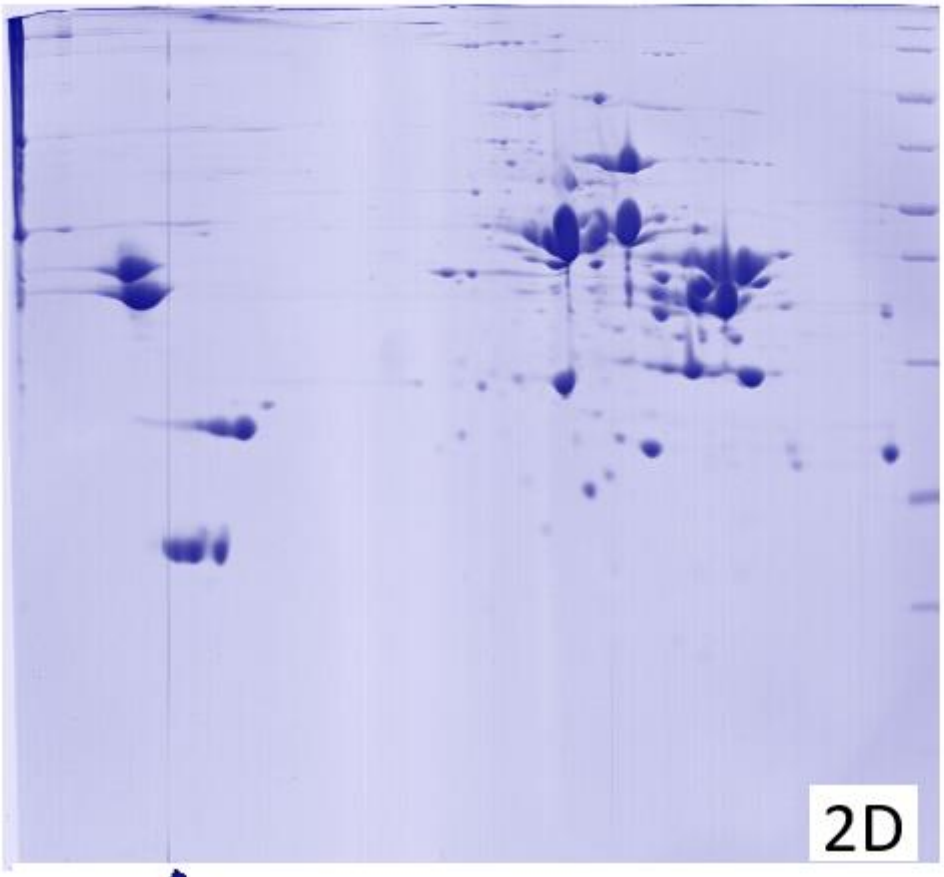


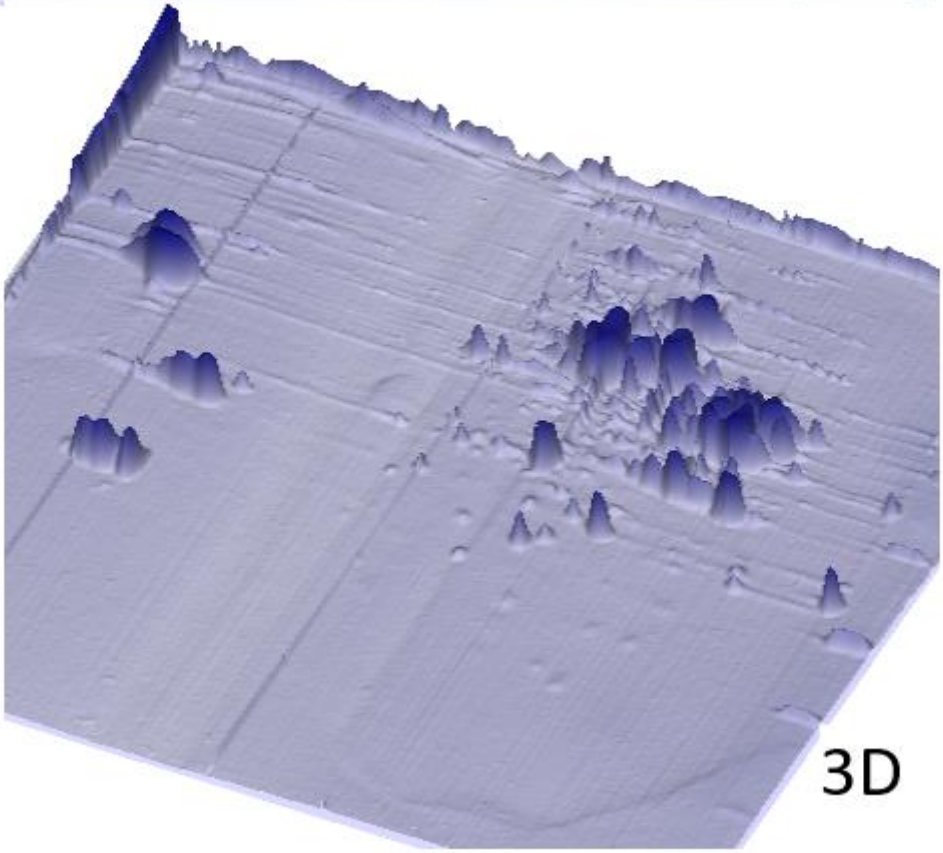
***brachiocephalicus* поросят**



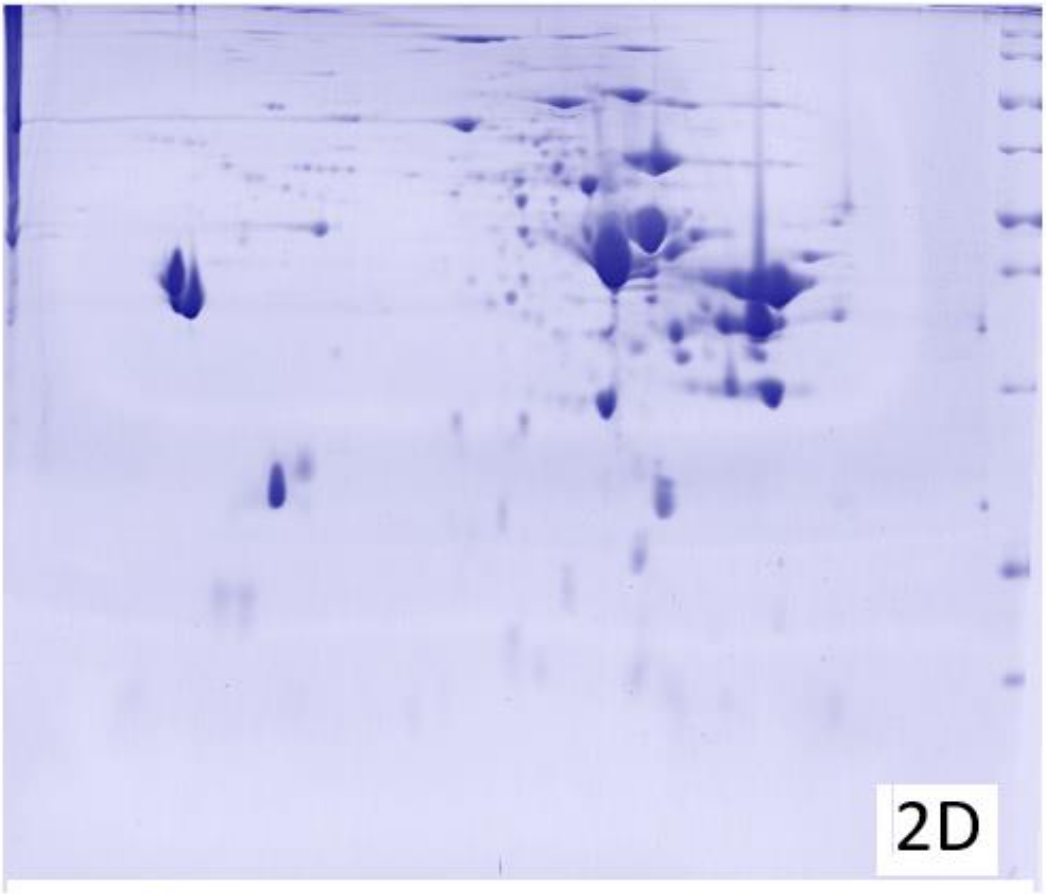


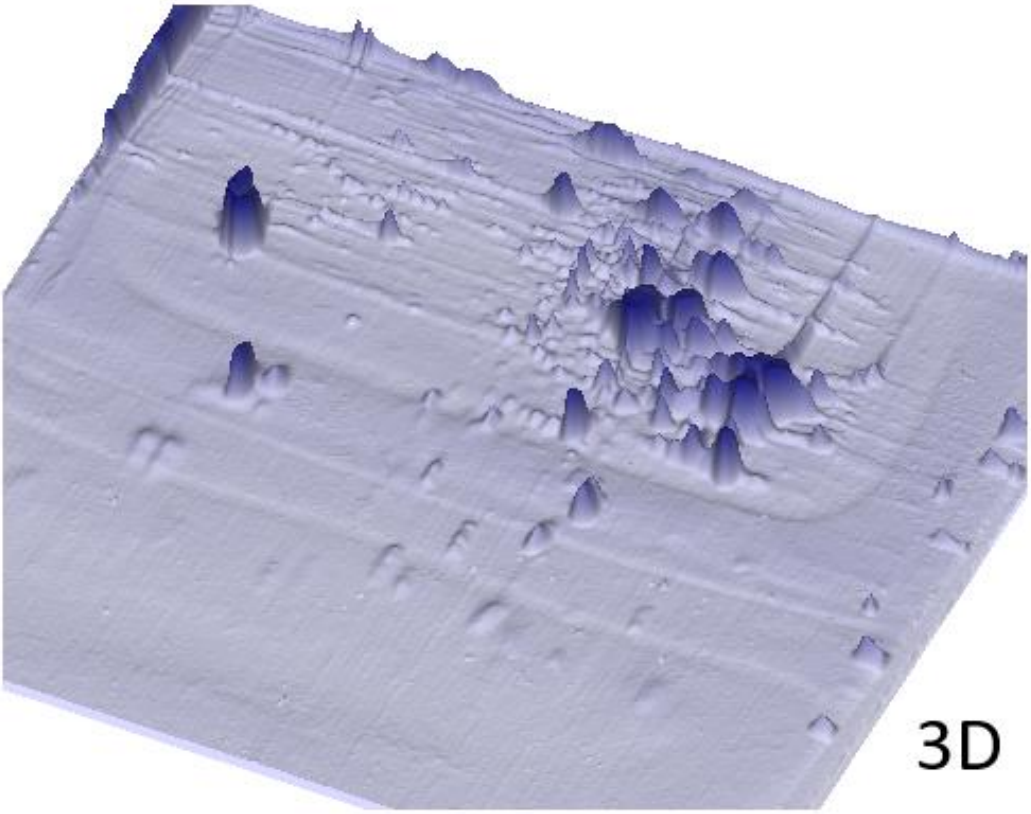
brachiocephalicus
половозрелых свиней



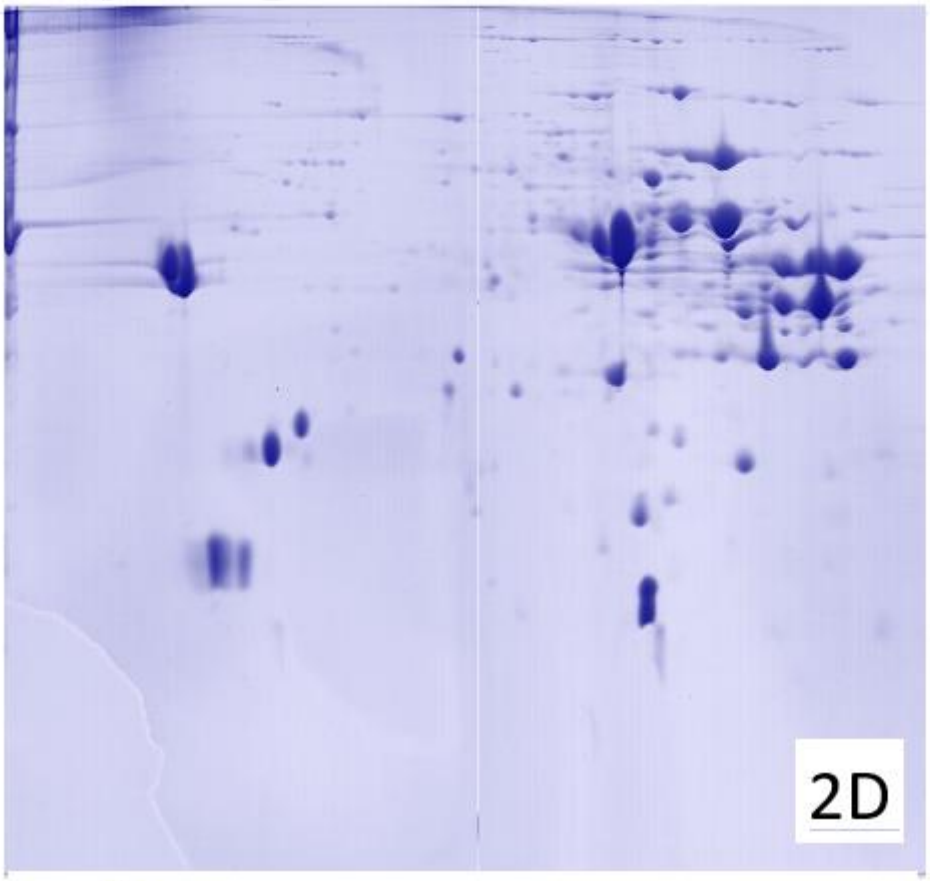


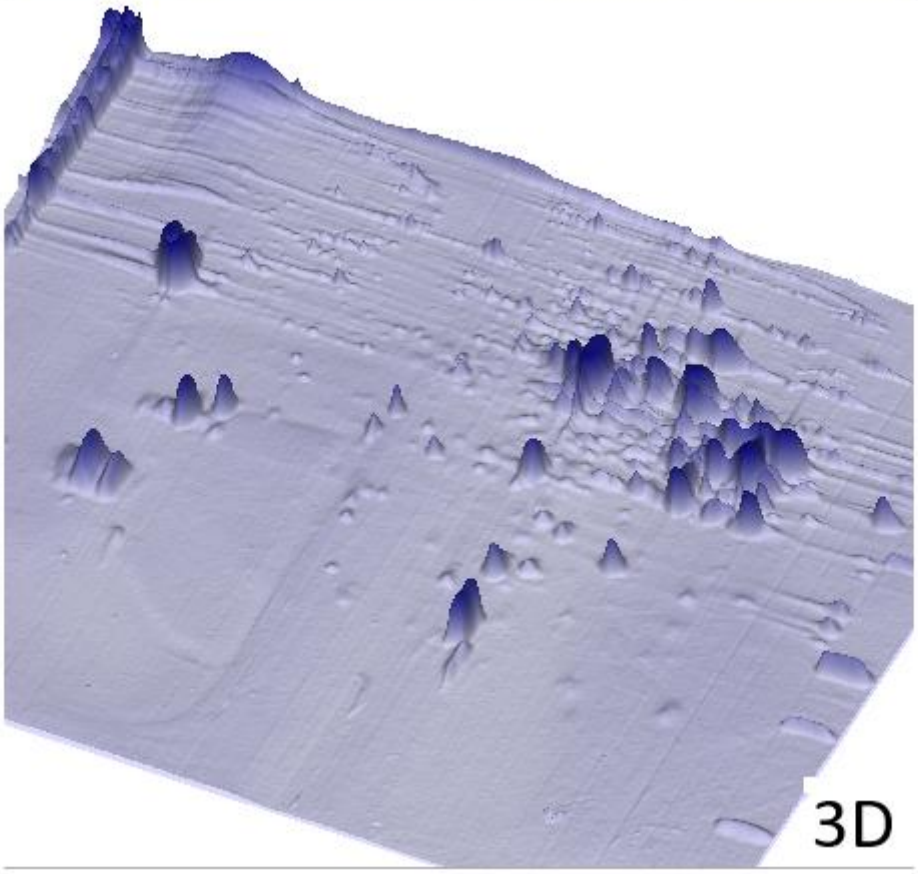
b. femoris поросят





***b. femoris* половозрелых свиней**





Приложение 3

Результаты идентификации ионизацией элекрораспылением ВЭЖХ-МС/МС вырезанных полос мышечных белков из одномерных электрофореграмм белков поросят и половозрелых свиней.

№	Код в UniProt	Название белка	Мм, кДа
1	2	3	4
1	A0A075B7J0	Ig-подобный домен, содержащий белок	10,4
2	A0A0A0MY58	Неохарактеризованный белок	32,7
3	A0A286ZBT3	Регулятор транспорта ионов, содержащий домен FXYD	10,9
4	A0A286ZIC1	Актин-деполимеризующий фактор (Бревин) (Гельсолин)	80,8
5	A0A286ZKG9	Пептидилпролилцис-транс-изомераза	22,3
6	A0A286ZNM0	Стабилизатор аксонемных микротрубочек 1	54,3
7	A0A286ZNN4	NADH-убихинонoксидоредуктаза 30 кДа субъедица	30,2
8	A0A286ZPR8	Фактор терминации митохондриальной транскрипции 3	45,9
9	A0A286ZPX6	Неохарактеризованный белок	220,9
10	A0A286ZSI0	Семафорин 6Б	94,9
11	A0A286ZSW6	Калнексин	67,6
12	A0A286ZTC8	NADH дегидрогеназа [убихинон] 1 альфа-субкомплексная субъединица 12	13,2
13	A0A286ZUN9	Комплекс I-23kD (НАДН-убихинон оксидоредуктаза субъединица 23 кДа)	22,2
14	A0A286ZW71	Низкомолекулярная фосфотирозиновая протеинфосфатаза	7,6
15	A0A286ZXA4	Неохарактеризованный белок	13,4
16	A0A286ZYL7	Дельта субъединицы F1 АТФ-синтазы	17,5
17	A0A286ZYM6	Субъединица АТФ-синтазы b	28,6
18	A0A286ZYX8	Фруктозо-бисфосфатальдолаза	39,8
19	A0A286ZZ98	Нейтральная альфа-глюкозидаза АВ	96,4
20	A0A287A0M1	Изоформа 2 белка теплового шока бета-7	18,5
21	A0A287A2B0	Субъединица АТФ-синтазы e, митохондриальная	8,8
22	A0A287A435	Неохарактеризованный белок	65,6
23	A0A287A481	Плазминоген	91,0
24	A0A287A518	Prohibitin	26,2
25	A0A287A5B4	Белок, содержащий домен BRO1	84,3
26	A0A287A7G3	Белок HIVEP 3	61,4
27	A0A287A8G6	Неохарактеризованный белок	89,2
28	A0A287A9T4	Белок, содержащий домен HATPase c	81,4
29	A0A287AAE2	Дигидроптеридин редуктаза	25,0
30	A0A287AAY6	Миозин-связывающий белок C1	133,8
31	A0A287AC42	ВАМП-ассоциированный белок А	27,7
32	A0A287ADB5	cutA гомолог толерантности к двухвалентным катионам	15,9
33	A0A287ADK7	Митохондриальный белок деления 1	16,8
34	A0A287AGA7	Фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназа	154,6

1	2	3	4
35	A0A287AH85	Аденилаткиназа 2, митохондриальная (АК 2) ,(АТФ-АМФ трансфосфорилаза 2)	25,6
36	A0A287AIU7	Тропонин С, медленные скелетные мышцы	20,8
37	A0A287AMA4	Неохарактеризованный белок	223,0
38	A0A287AMU5	40S рибосомный белок S15	17,0
39	A0A287AN76	Митохондриальная изоформа 1 белка-носителя 2-оксоглутарата / малата	34,1
40	A0A287AP66	60S рибосомный белок L12	14,2
41	A0A287APZ8	Супероксиддисмутаза, митохондриальная	52,5
42	A0A287ARA0	Гистон H2B	13,5
43	A0A287ARU4	S-фаза-киназ-ассоциированный белок 1	18,9
44	A0A287AVR5	Фактор транскрипции HLF	30,2
45	A0A287AVS8	Актин альфа 2, гладкие мышцы	39,9
46	A0A287AWI9	Коэффициент удлинения 2	95,4
47	A0A287AXF7	Семейство со сходством последовательностей 162 члена A	16,5
48	A0A287AXR5	Белок активации тирозин-3-монооксигеназы / триптофан-5-монооксигеназы zeta	26,7
49	A0A287AZF9	Цитохром c1 (цитохром C1, гем-белок, митохондриальный)	35,4
50	A0A287AZV7	НАДН-дегидрогеназа [убихинон] 1 субъединица C2	12,7
51	A0A287B0I4	Неохарактеризованный белок	21,4
52	A0A287B1N7	Пептидилпролилизомераза	27,7
53	A0A287B254	Двойная серин / треонин и тирозин протеинкиназа	100,1
54	A0A287B719	митохондриальный рибосомный белок S36	11,5
55	A0A287B8J5	Белок теплового шока HSP 90-альфа	87,7
56	A0A287BAW0	Комплекс I субъединица B13 (субъединица 13 кДа-B NADH-убихинон оксидоредуктаза)	13,3
57	A0A287BBN2	Миелиновый белок P2	17,1
58	A0A287BBV8	Субъединица альфа-зависимого кальциевого канала R-типа	256,3
59	A0A287BCZ5	Легкая цепь миозина 1	35,1
60	A0A287BF12	белок 1-подобный, содержащий стержневой домен талина	49,6
61	A0A287BHE7	40S рибосомный белок S14	16,3
62	A0A287BPW8	Комплекс I-B15	15,1
63	A0A287BQQ3	Аддуцин 3	71,2
64	A0A287BS35	N-ацилнейраминат цитидилтрансфераза	60,5
65	A0A2C9F352	Член семейства SDR дегидрогеназы / редуктазы 4	26,3
66	A0A2C9F3A3	Субъединица АТФ-синтазы периферического стебля OSCP (субъединица АТФ-синтазы, митохондриальная) (белок, придающий чувствительность к олигомицину)	23,4
67	A0A2C9F3E7	Субъединица цитохрома b560 сукцинатдегидрогеназы, митохондриальная	16,0
68	A0A3G5MTU3	Антиген MHC класса I (фрагмент)	30,4
69	A0SNU7	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фрагмент)	27,8
70	A1XQS3	Митохондриальный NDUFA4	9,3
71	A1XQV5	Тропонин C, скелетные мышцы	18,2
72	A1XQV9	MLC2v (Фрагмент)	16,9

1	2	3	4
73	A4H2I7	Декорин (Костный протеогликан II) (фрагмент)	9,9
74	A4UXY9	Нуклеозиддифосфаткиназа	17,2
75	A5A750	Металлопептидаза ADAM с мотивом 20 тромбоспондина типа 1 (фрагмент)	147,6
76	A8D737	Кадгерин-13	78,2
77	B1Q039	Альфа (B) -кристаллин (цепь альфа-кристаллина B)	20,1
78	B2CZR7	CFL2b вариант 1	18,7
79	B5KJG2	Фосфоглицератмутаза	28,7
80	B9TRX1	Регулятор роста нейронов	25,3
81	C0LSI8	Белок, связывающий жирные кислоты 3 (фрагмент)	11,0
82	C7S2Z6	Малый модификатор, связанный с убиквитином (SUMO)	10,9
83	D0G778	Фактор ингибирования миграции макрофагов (фрагмент)	11,9
84	D2JYW3	F-актин-кэпирующая белковая субъединица бета	30,7
85	F1RFD4	Субъединица мембраны АТФ-синтазы DAPIT	6,4
86	F1RFH9	Кальций-транспортная АТФаза	110,1
87	F1RFY1	Профилин	22,5
88	F1RFY2	2-фосфо-D-глицерат гидролаза	45,3
89	F1RG17	Нуклеозиндифосфаткиназа	19,1
90	F1RG31	Гидроксиацилглутатион гидролаза	39,1
91	F1RGQ5	Анкириновый повтор и домен FYVE	19,5
92	F1RGX4	доменсодержащий белок	15,2
93	F1RHL9	Актинин альфа 2 (изоформа 1 альфа-актинина-2)	103,7
94	F1RI52	Белок, отвечающий за ассоцию с доменом DIL	115,6
95	F1RII7	Бета субъединица гемоглобина	16,2
96	F1RKG8	Нехарактеризованный белок	21,0
97	F1RLH7	Неохарактеризованный белок	9,8
98	F1RM62	Семейство белков теплового шока B (малые), член 6	16,8
99	F1RNI5	Комплекс I-B9	18,3
100	F1RNL1	Неохарактеризованный белок	74,3
101	F1RNX2	Белок PDCD5	18,7
102	F1RNZ1	Белок, содержащий домен Риске	31,8
103	F1RQQ8	Альфа-1,4 глюканфосфорилаза	98,0
104	F1RRK1	Пеканекс-подобный протеин	221,0
105	F1RRY0	Ран-связывающий белок 17	126,3
106	F1RRY6	простагландин E синтаза 2	41,8
107	F1RU49	Актинин альфа 3	94,1
108	F1RWJ6	Аминопептидаза	99,6
109	F1RWL7	НАДН-убихинон-оксидоредуктаза, субъединица ASHI	21,7
110	F1RYZ0	60S кислый рибосомный белок P2	11,6
111	F1RZQ6	Транслоказ ADP/ATP (ADP, белок-носитель АТФ)	28,1
112	F1S166	Гомолог B белка unc-45	98,8
113	F1S192	Префолдин 2	16,7
114	F1S1G8	Аминоксидаза	76,7

1	2	3	4
115	F1S291	Rho GTPase, активирующий белок 4	105,4
116	F1S2E3	Пептидил-пролил цис-транс изомераза	25,2
117	F1S2E6	субъединица РНК-полимеразы	155,8
118	F1S2I8	Член 3 семейства белков, способствующих полимеризации тубулина	18,9
119	F1S3W0	Субъединица 6 комплекса цитохрома b-c1	10,7
120	F1S418	Пероксиредоксин 3	28,5
121	F1S6Q1	Комплекс I-B16.6	16,9
122	F1S7H3	Миозиновая легкоцепочечная киназа 2, скелетных мышц	66,6
123	F1SA98	Тирозин 3-монооксигеназа	25,4
124	F1SAB6	Белок, содержащий домен-носитель	15,6
125	F1SAR5	Глутаредоксин 5	16,6
126	F1SDR7	Бета-белок активации тирозин-3-монооксигеназы / триптофан-5-монооксигеназы	28,3
127	F1SE27	Напряжение-зависимый белок анион-селективного канала 3	11,1
128	F1SFG1	Белок FAM43A	46,3
129	F1SGC6	Комплекс I-SGDH (NADH дегидрогеназа [убихинон] 1 бета-субкомплексная субъедица 5, митохондриальная) (NADH-убихиноноксидоредуктаза SGDH субъедица)	21,6
130	F1SGP8	Ретикулокалбин-1	46,6
131	F1SH71	ДНК геликаза B	27,3
132	F1SHU0	3-гидроксиизобутиратдегидрогеназа	18,0
133	F1SI50	Комплекс I-B12 (субъединица B12 НАДН-убихинон оксидоредуктаза)	12,8
134	F1SIH8	Валозинсодержащий белок	91,0
135	F1SJ34	Цитохром C оксидазы полипептид	16,7
136	F1SKJ5	Эукариотический фактор инициации трансляции 3 субъединиц D	64,0
137	F1SKJ8	Парвальбумин альфа	12,1
138	F1SKY2	Омега-амидаза NIT2	31,2
139	F1SLC2	Гомолог субъединицы TOM22 рецептора импорта митохондрий (гомолог субъединицы 22 кДа транслоказы внешней мембраны)	15,4
140	F1SLF0	Сепиаптерин редуктаза	28,6
141	F1SLR1	Комплекс I-19kD (NADH дегидрогеназа [убихинон] 1 альфа-субкомплексная субъединица	27,7
142	F1SLZ3	Неохарактеризованный белок	23,4
143	F1SMX9	Кадгерин 7 (Кадгерин-7 изоформа 1 препропротеин)	87,0
144	F1SQ14	Белок, содержащий основной домен UBC	11,9
145	F1SQT3	Белок-носитель фосфата, митохондриальный (белок-переносчик фосфата) (член 3 семейства 25-го носителя растворенного вещества)	39,9
146	F1SRK6	Эндоплазмин	92,4
147	F1SRY2	Пироглутамилпептидаза	24,5
148	F1SS65	Миозин-4	223,2
149	F1SSL6	Протеасомная субъединица альфа-типа	28,4
150	F1SUG4	Убиквитин-подобный домен, содержащий белок	13,2

1	2	3	4
151	F2Q9A3	Пептидилпролилцис-транс-изомераза	17,9
152	F2Z4Z1	Неохарактеризованный белок	28,3
153	F2Z545	Элонгин-С	14,4
154	H6TBN0	Тиоредоксин	11,8
155	H6UI30	Белок, связывающий жирные кислоты сердца	14,8
156	I3L7W7	Тетратрикопептидный повторяющийся домен 21А	144,8
157	I3LAK5	Неохарактеризованный белок	63,9
158	I3LC10	Ацилфосфатаза	14,1
159	I3LEI8	1,2-дигидрокси-3-кето-5-метилтиопентеновая диоксигеназа	21,6
160	I3LEM5	Каталитическая субъединица А1, подобная 2	57,3
161	I3LER5	Субъединица 4 цитохром С оксидазы	19,6
162	I3LK43	Комплекс I-20 кДа (НАДН-убихинон оксидоредуктаза, субъединица 20 кДа)	21,8
163	I3LLY3	Нехарактеризованный белок	102,3
164	I3LNW6	Геминин-спиральный домен	37,6
165	I3LQ38	НАДН-дегидрогеназа [убихинон] железо-серный белок 4, митохондриальный (Комплекс I-18 кДа)	16,5
166	I3LQ51	протеасомная субъединица бета типа-1	22,4
167	I3LRD3	Центромерный белок Е	308,4
168	I3LTC6	Инозитол-1-монофосфатаза	39,5
169	K4EJ64	Миозиновая легкая цепь 3	21,9
170	K7GLN4	Пероксиредоксин 4	30,7
171	K9IVI1	Оксоглутаратдегидрогеназа	115,6
172	M3TYX7	Семейство носителей растворенного вещества 39 (транспортер цинка)	49,9
173	Q19PY1	Альфа-1,4-глюканфосфорилаза (фрагмент)	84,0
174	Q1W2G0	Стратифин	27,9
175	Q29376	Кальмодулин (фрагмент)	13,5
176	Q29579	Гистон Н2А (фрагмент)	12,0
177	Q2EN74	Белок, связывающий жирные кислоты 5	15,2
178	Q2VTP6	Пептидилпролилизомераза	25,4
179	Q4JH15	Тропонин I (изоформа быстро сокращающегося скелета тропонина I) (тропонин I, изоформа 1 быстрых скелетных мышц) (тропонин I2, тип быстрого скелета)	21,3
180	Q4LAX1	Креатинкиназа (EC 2.7.3.2) (фрагмент)	14,9
181	Q5XLD2	Легкая цепь миозина, фосфорилируемые, быстрые скелетные мышцы (регуляторная легкая цепь миозина 2)	19,0
182	Q6IM77	Ретикулон	22,2
183	Q6J267	Галектин (фрагмент)	14,6
184	Q6QAS1	Глутаредоксин (фрагмент)	9,4
185	Q6WSP6	Митохондриальный белок теплового шока 10 кДа	10,9
186	Q6XGY2	2,4-диеноил-КоА редуктаза (фрагмент)	31,9
187	Q95ME5	Супероксиддисмутаза 1 (фрагмент)	15,2
188	R4H1Z8	Жирно-кислотосвязывающий белок адипоцита (Жирно-кислотосвязывающий белок 4)	14,7

Приложение 4

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

УТВЕРЖДАЮ
Директор
_____ О.А. Кузнецова
«17» 05 2021 г.

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ **СТО 00419779-011-2021**

КОНСЕРВЫ КУСКОВЫЕ МЯСНЫЕ И МЯСОСОДЕРЖАЩИЕ

Методика подготовки проб для проведения 2D - электрофореза

Москва
2021

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным Законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании»; правила применения стандартов организации – ГОСТ Р 1.4 – 2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты организаций. Общие положения»

Сведения о стандарте организации:

1. РАЗРАБОТАН ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом по «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН № 27 от «24» 05 2021 г.

3. **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

Настоящий стандарт организации не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения ФГБНУ **«ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН**

Содержание

1	Область применения	4
2	Нормативные ссылки	4
3	Термины и определения	5
4	Требования безопасности	6
5	Отбор проб	6
6	Аппаратура, вспомогательное оборудование и материалы	6
7	Порядок постановки исследований	7

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

КОНСЕРВЫ КУСКОВЫЕ МЯСНЫЕ И МЯСОСОДЕРЖАЩИЕ

Методика подготовки проб для проведения 2D - электрофореза

Дата введения – 2021–00–00

1 Область применения

Стандарт организации (далее – СТО) распространяется на методологию подготовки проб кусковых мясных и мясосодержащих консервов для проведения 2D-электрофореза консервов группы «А» (далее - консервы).

Стандарт организации предназначен для проведения научноисследовательских работ в рамках выполнения Программы фундаментальных научных исследований РАН (далее – НИР) по исследованию влияния режимов тепловой обработки и условий хранения мясных кусковых консервов группы «А» на степень деструкции белков.

Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ Р 12.1.019-2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ OIML R 76-1-2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 4025-95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые.

Технические условия

ГОСТ 8756.0-70 Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 14919-83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20469-95 Электромясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 21241-89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26272-98 Часы электронно-механические кварцевые наручные и карманные. Общие технические условия

ГОСТ 26678-85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 33102-2014 Продукция мясной промышленности. Классификация

ГОСТ 33741-2015 Консервы мясные и мясосодержащие. Методы определения органолептических показателей, массы нетто и массовой доли составных частей

ГОСТ Р 52361-2018 Контроль объекта аналитический. Термины и определения Примечание - При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по [1], ГОСТ 33102, ГОСТ Р 52361, а также следующий термин с соответствующим определением:

Электрофорез двумерный - способ разделения сложных смесей белков, сочетающий в себе электрофорез белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и изоэлектрическое фокусирование.

4 Требования безопасности

4.1 Помещение, в котором проводят испытания, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.2 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ Р 12.1.019.

4.3 При подготовке и проведении анализа необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

5 Отбор проб

Отбор проб проводят по ГОСТ 8756.0.

Проба должна быть представительной, а также без повреждений и изменений качества продукта при транспортировании и хранении.

От представительной пробы отбирают пробу массой не менее 200 г.

Пробу хранят таким образом, чтобы предотвратить порчу и изменение химического состава.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование и материалы

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального или высокого класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,001 г.

Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919.

Баня водяная.

Мясорубка механическая по ГОСТ 4025 или электрическая по ГОСТ 20469 с решеткой, диаметр отверстий которой не более 4,5 мм, или гомогенизатор.

Шкаф сушильный электрический, обеспечивающий поддержание температуры (80 ± 2) °С.

Термометр жидкостной стеклянный по ГОСТ 28498 с диапазоном измеряемых температур от 0 °С до 100 °С.

Часы электронно-механические по ГОСТ 26272.

Стакан химический В-1-100, В-1-250, В-1-400, В-1-1000 ТС по ГОСТ 25336.

Воронка В-56(75)-80 ХС по ГОСТ 25336.

Шпатель или ложку по ГОСТ 9147.

Пинцет медицинский по ГОСТ 21241.

Сита из проволочной сетки с размерами отверстий 2-3 мм.

Ступка лабораторная с пестиком по ГОСТ 9147.

Холодильник по ГОСТ 26678.

7 Порядок подготовки проб консервов

7.1 Сущность метода

Метод основан на разделении содержимого потребительской упаковки с продуктом на составные части, отделении выплавленного жира и последующем тонким измельчением пробы.

7.2 Подготовка к испытанию

7.2.1 Потребительскую упаковку с продуктом, предназначенную для испытания, очищают, снимают бумажные или самоклеющиеся этикетки и, при необходимости, моют и подсушивают.

7.2.2 Потребительскую упаковку с содержимым перед вскрытием подогревают на водяной бане или в сушильном шкафу при температуре (80±2) °С:

в течение 20 мин – для консервов массой нетто до 500,0 г; в течение 30 мин – массой нетто от 500,0 до 1000,0 г.

Перед подогреванием в сушильном шкафу в крышке банки или лотка (контейнера), в верхней части корпуса потребительской упаковки делают прокол. При подогревании на водяной бане консервов в стеклянной упаковке уровень воды должен быть ниже уровня крышки на 2,0 см.

7.3 Проведение испытания

7.3.1 Подготовленную к испытаниям потребительскую упаковку с продуктом взвешивают, затем вскрывают на 2/3 или 3/4 окружности банки или периметра лотка (контейнера), или длины термошва пакета. Потребительскую упаковку устанавливают наклонно в воронку и осторожно сливают жидкую часть консервов в предварительно взвешенный лабораторный стакан в течение 10-15 мин, причем каждые 5 мин потребительскую упаковку с консервами несколько раз осторожно поворачивают. Допускается разделение составных частей консервов с применением сит. При этом потребительскую упаковку вскрывают по 7.3.1 настоящего СТО и переносят содержимое

на сито, поставленное над предварительно взвешенным лабораторным стаканом. Продукт распределяют равномерно шпателем по поверхности сита слоем до 50 мм и дают стекать жидкости не менее 5 мин.

7.3.2. Для удаления выплавленного жира лабораторный стакан с жидкой частью консервов по 7.3.1 помещают в холодильник и охлаждают до температуры 0 °С – 8 °С. Затвердевший жир снимают с поверхности жидкой составной части консервов.

7.3.3 Твердые составные части консервов осторожно извлекают пинцетом или ложкой и измельчают на мясорубке, гомогенизаторе или растирают в ступке.

7.3.4 Измельченные твердые части консервов объединяют с бульоном и гомогенизируют.

7.3.5 От подготовленной пробы отбирают навеску для последующего определения фракционного состава белков мясной системы методом двумерного электрофореза, причем каждый раз перед взятием навески всю массу тщательно перемешивают.

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 034/2013 О безопасности мяса и мясной продукции

УДК 664.93:006.037 ОКС 67.020 Н 13 ОКПД2 72.19.2

Ключевые слова: консервы, проба, пробоподготовка, двумерный электрофорез

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Отдел научно-прикладных и технологических разработок:

главный научный сотрудник В.Б. Крылова

ведущий научный сотрудник Т.В. Густова

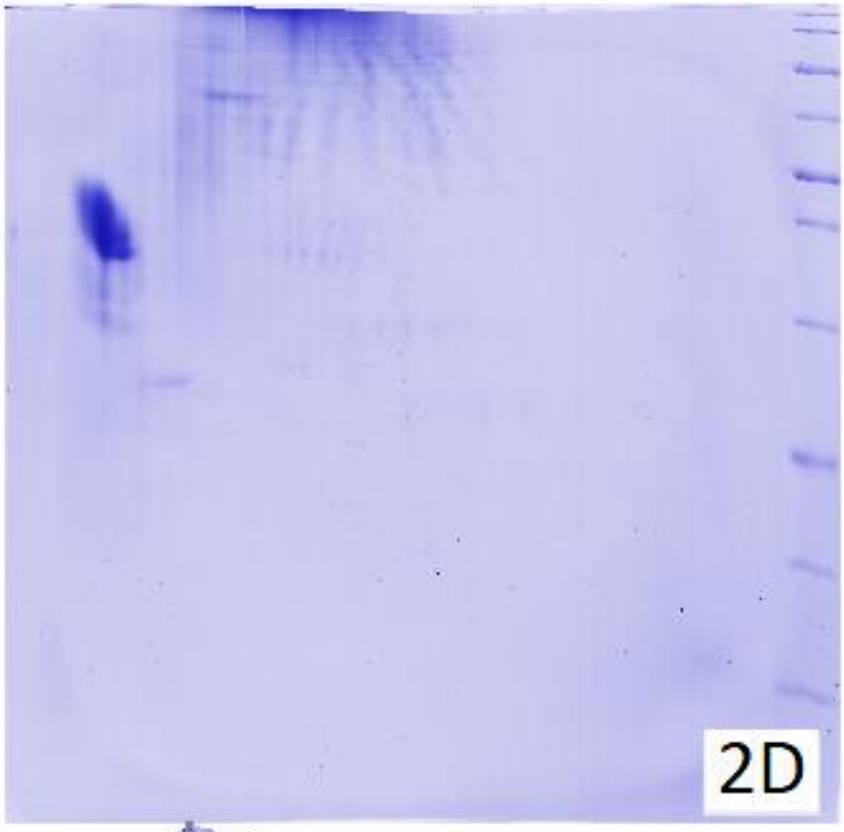
Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения:

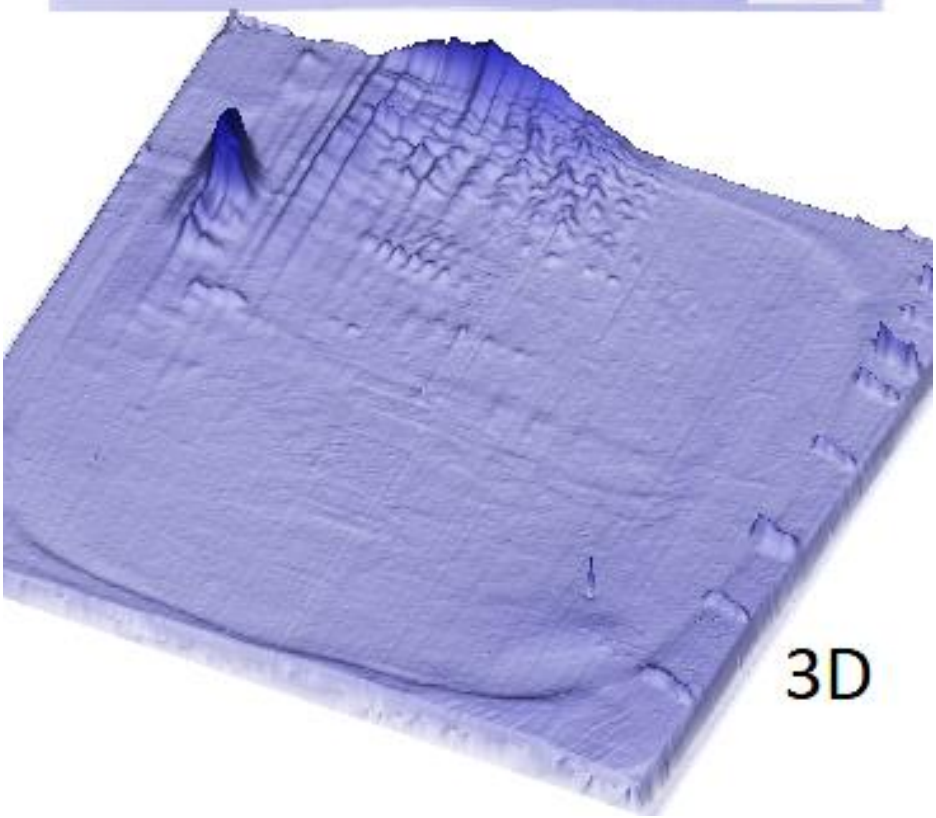
младший научный сотрудник А.Г. Ахремко

Приложение 5

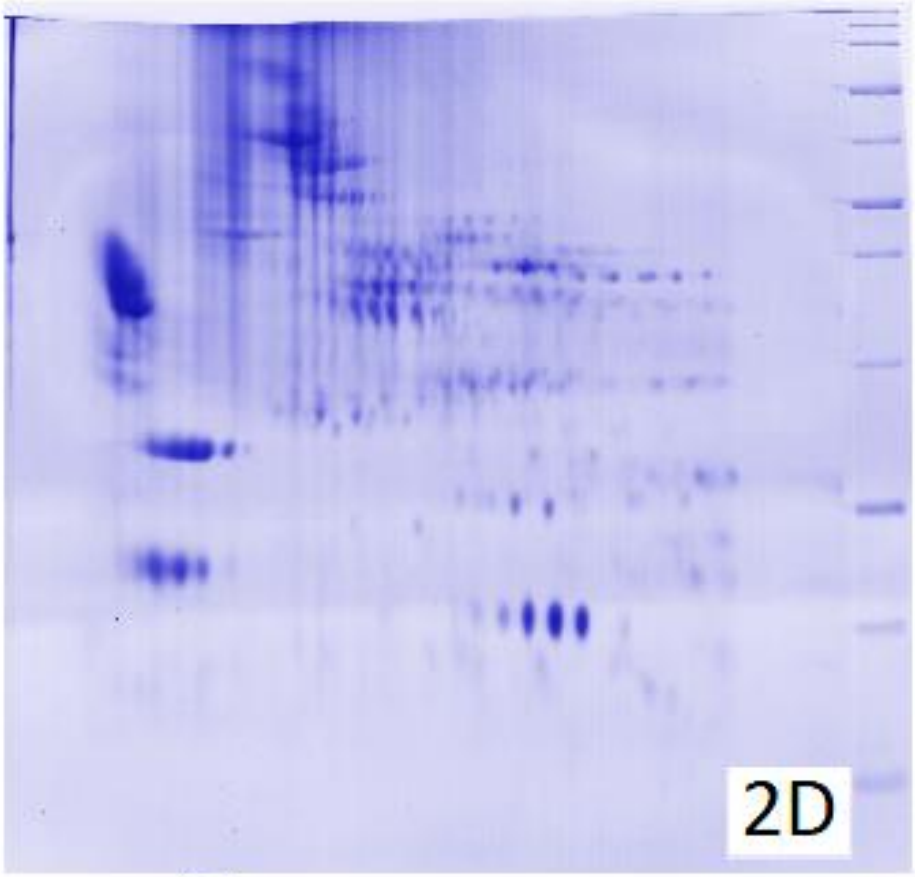
Протеомные карты составных частей кусковых консервов из говядины

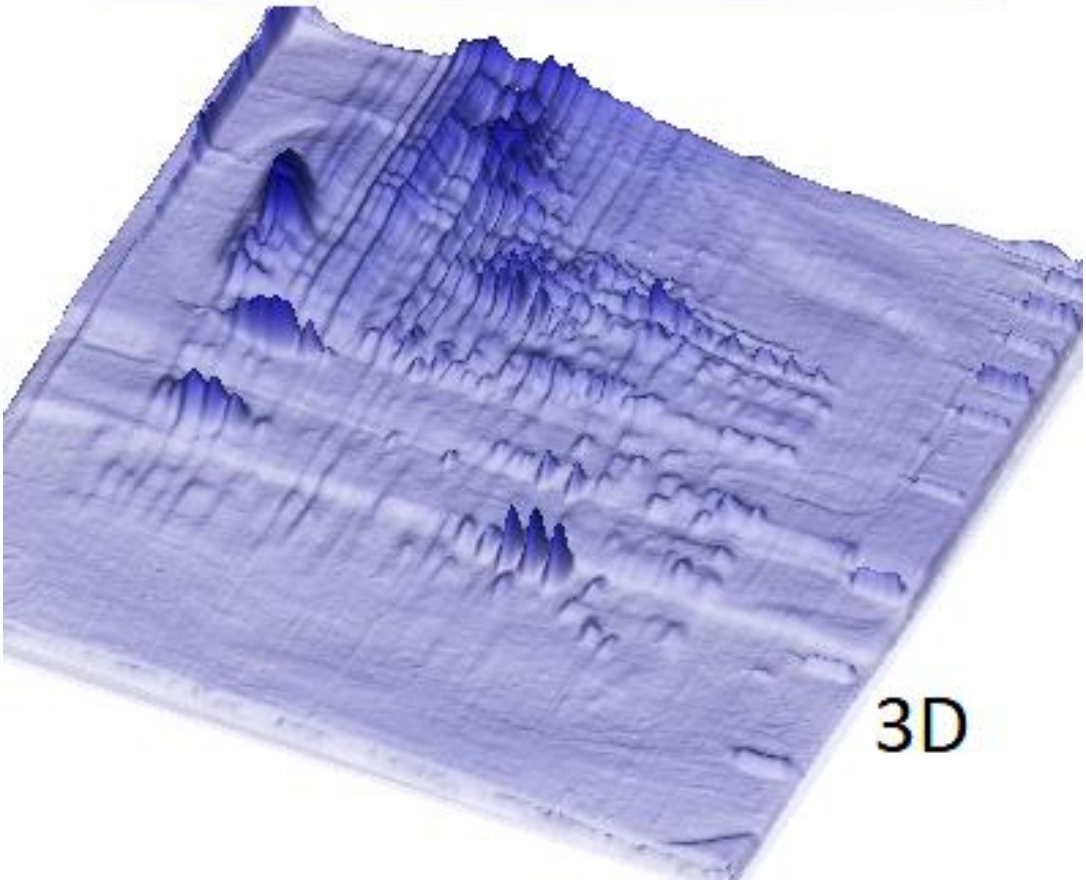
Бульон (отдельно)



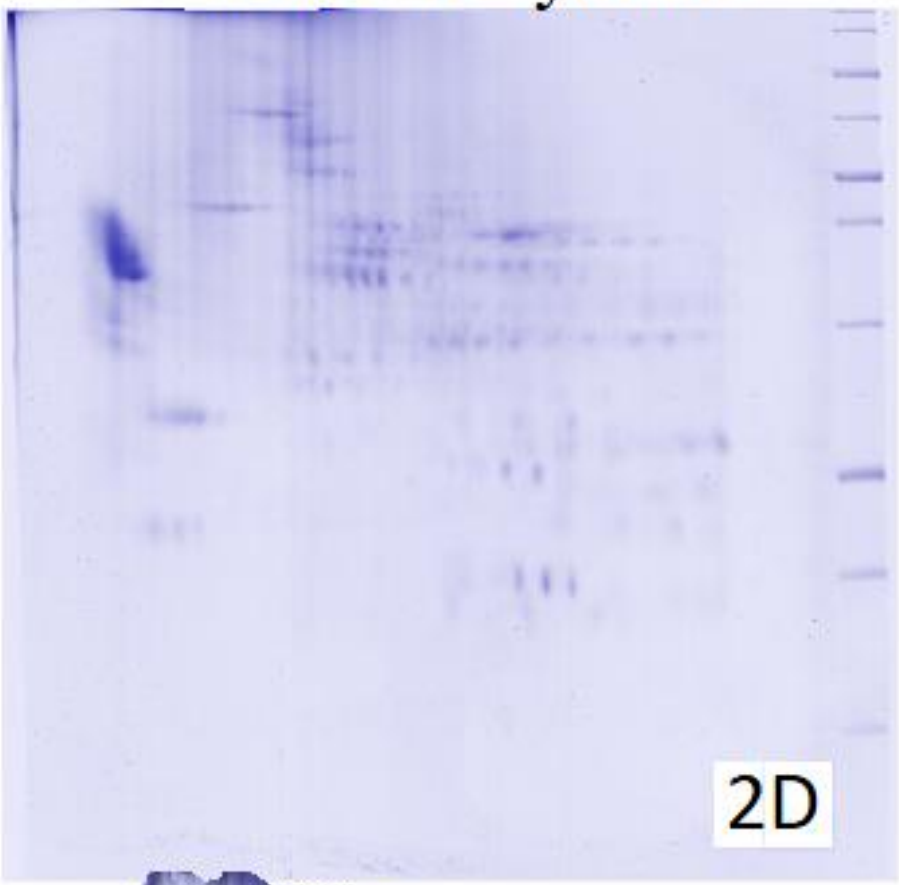


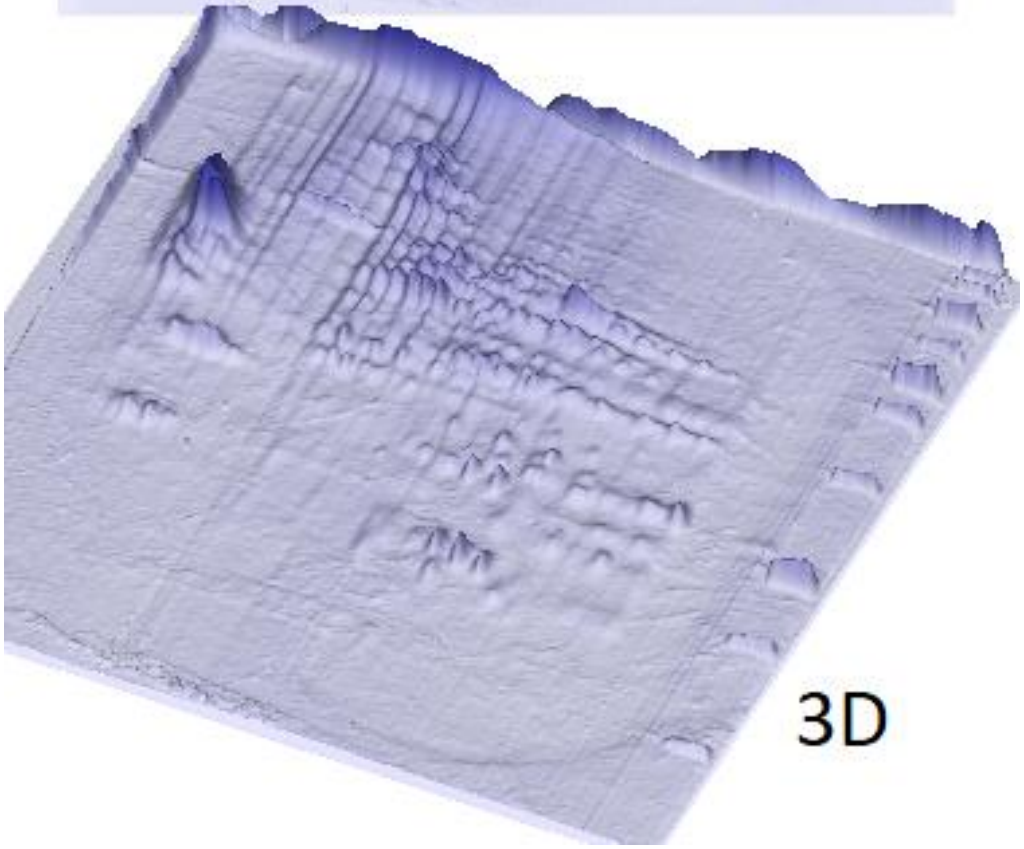
Кусочки мяса (отдельно)



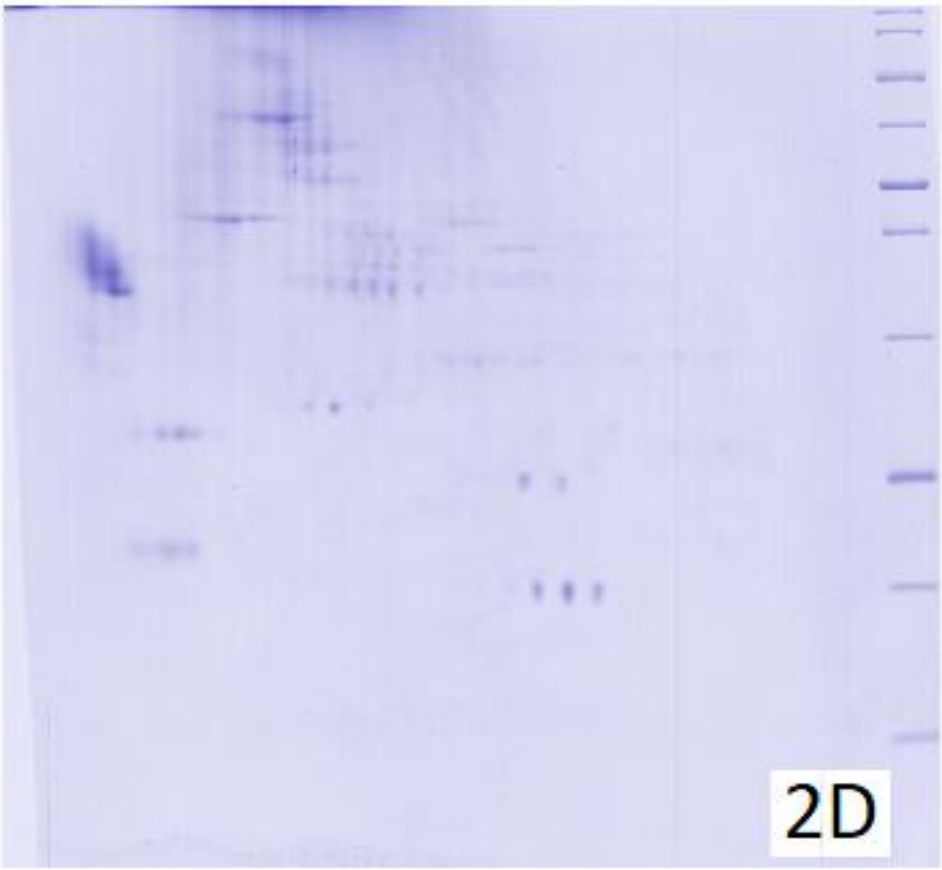


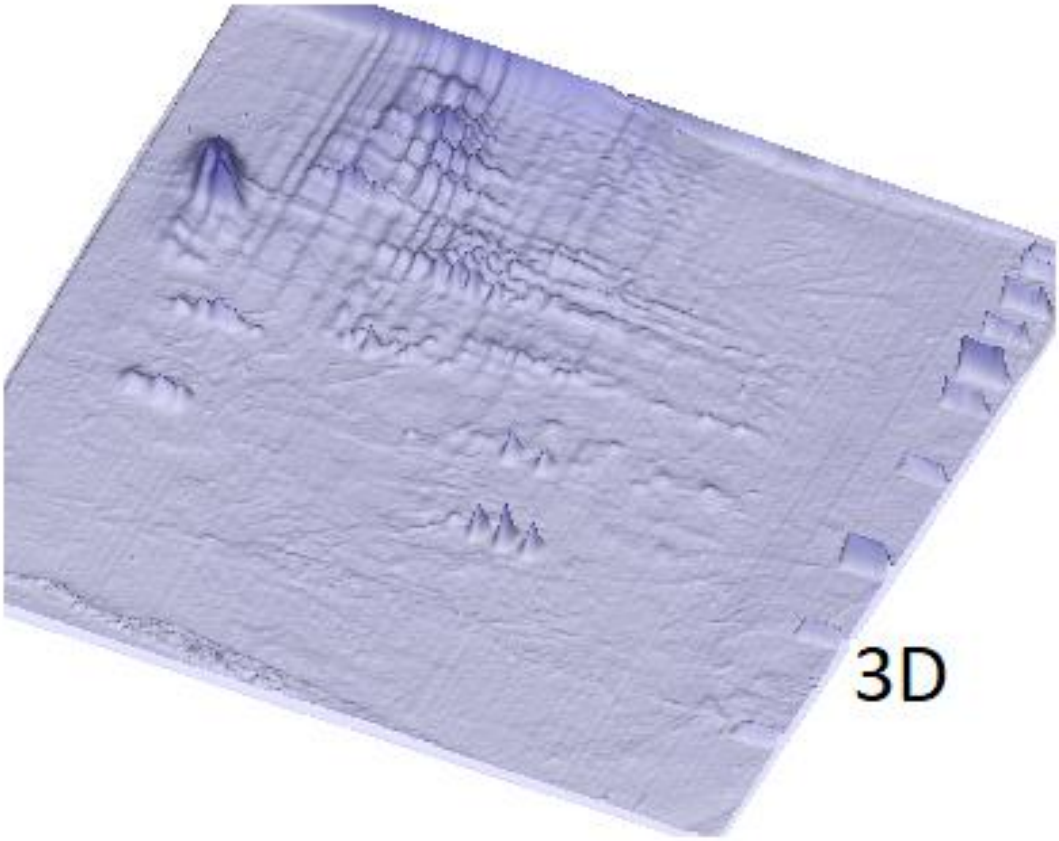
Мясо и бульон





Смесь (средняя проба)

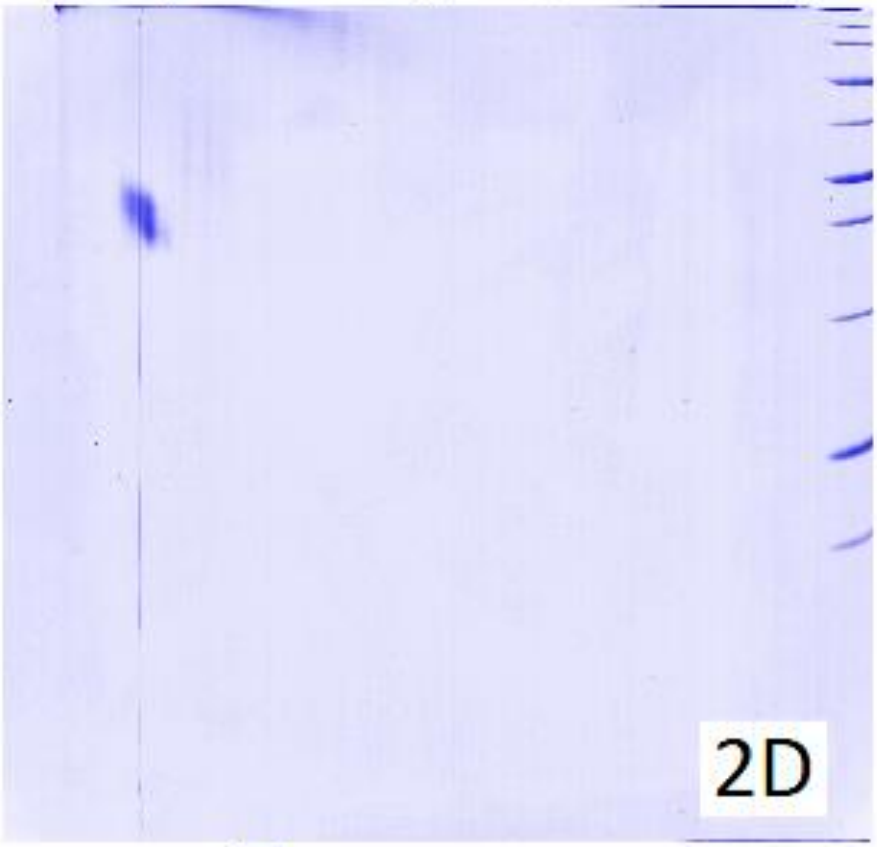


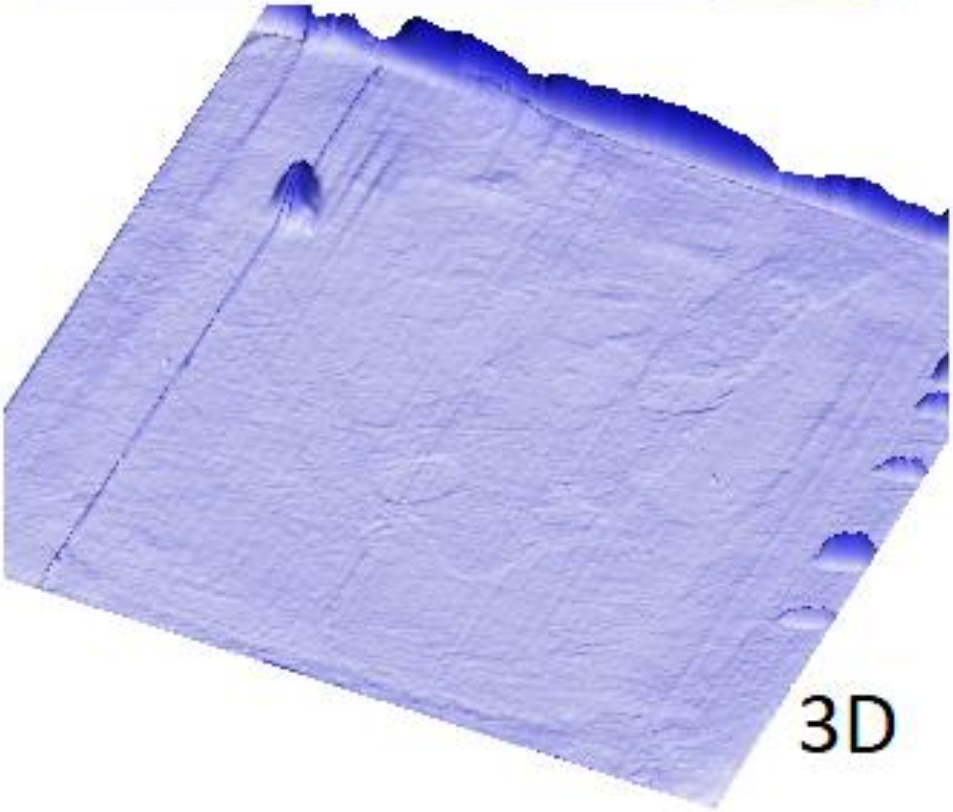


Приложение 6

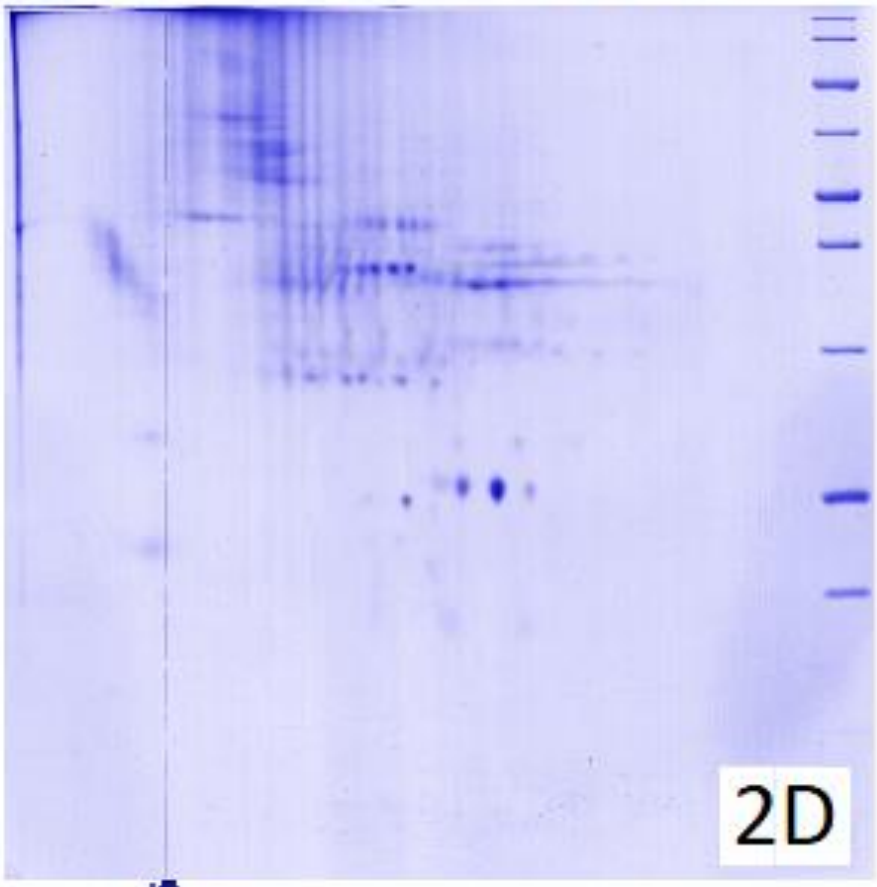
Протеомные карты составных частей кусковых консервов из свинины

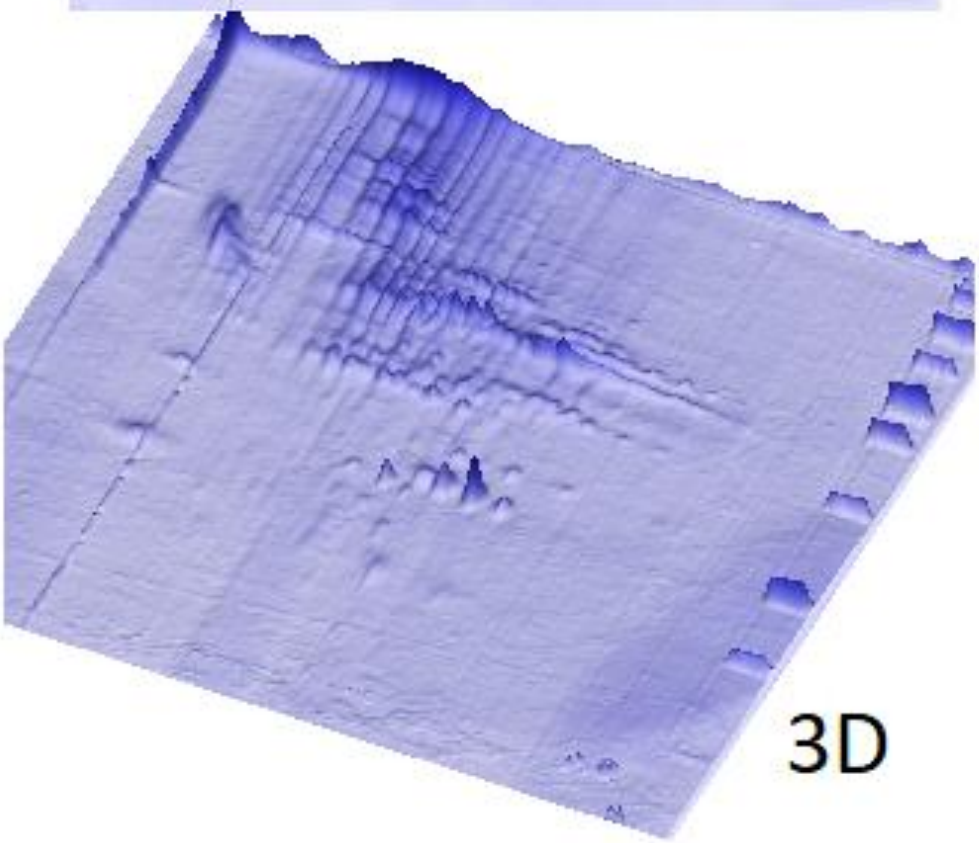
Бульон (отдельно)



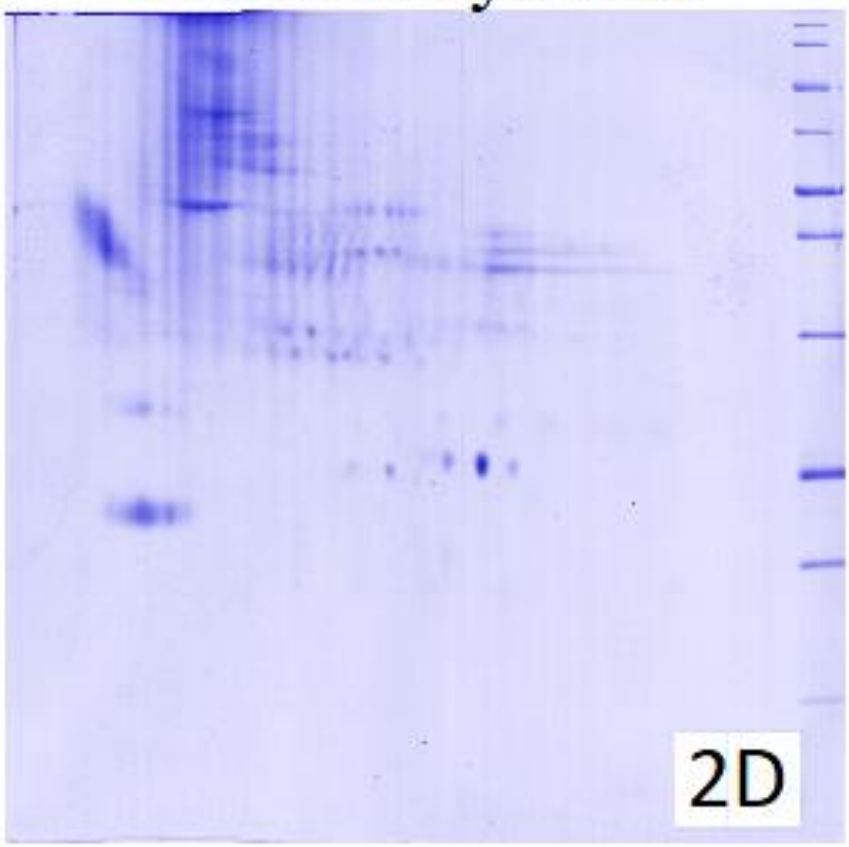


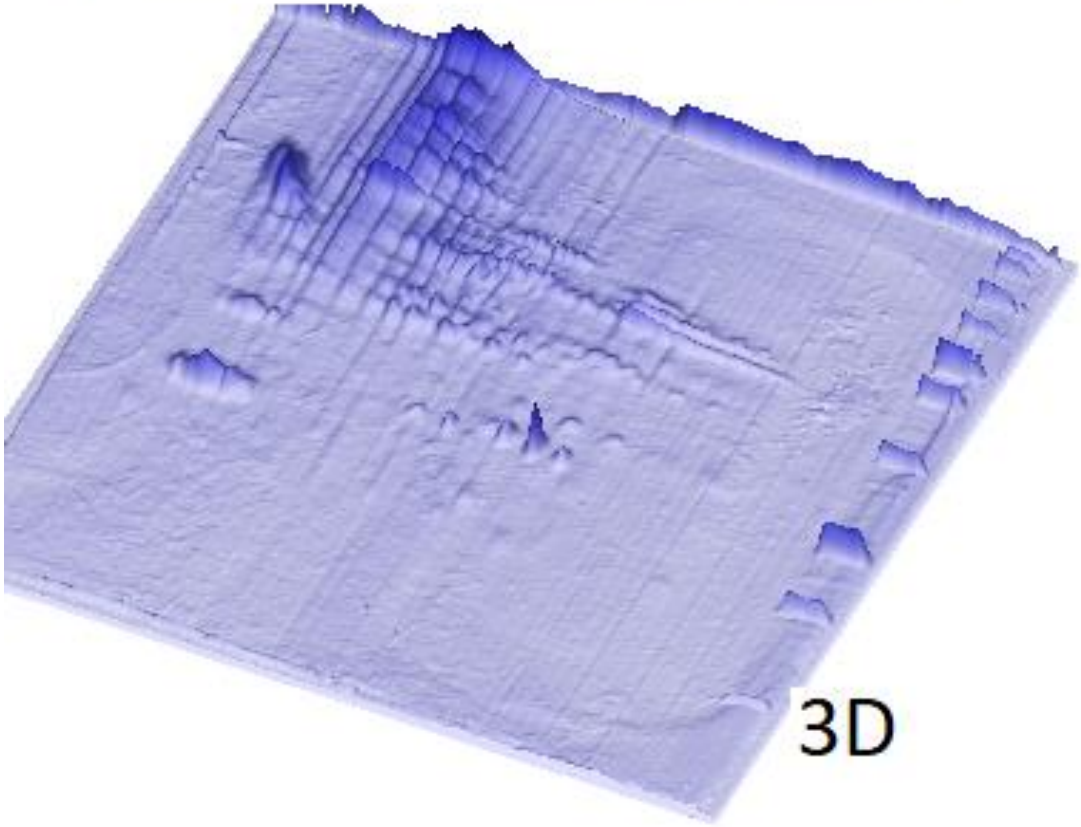
Кусочки мяса (отдельно)



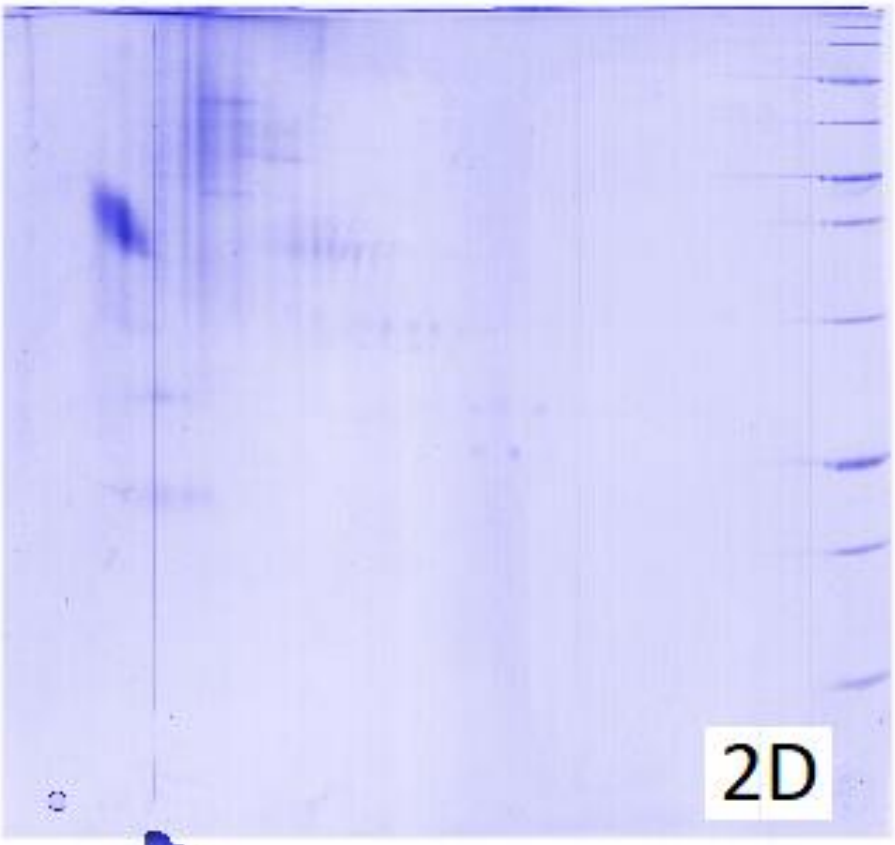


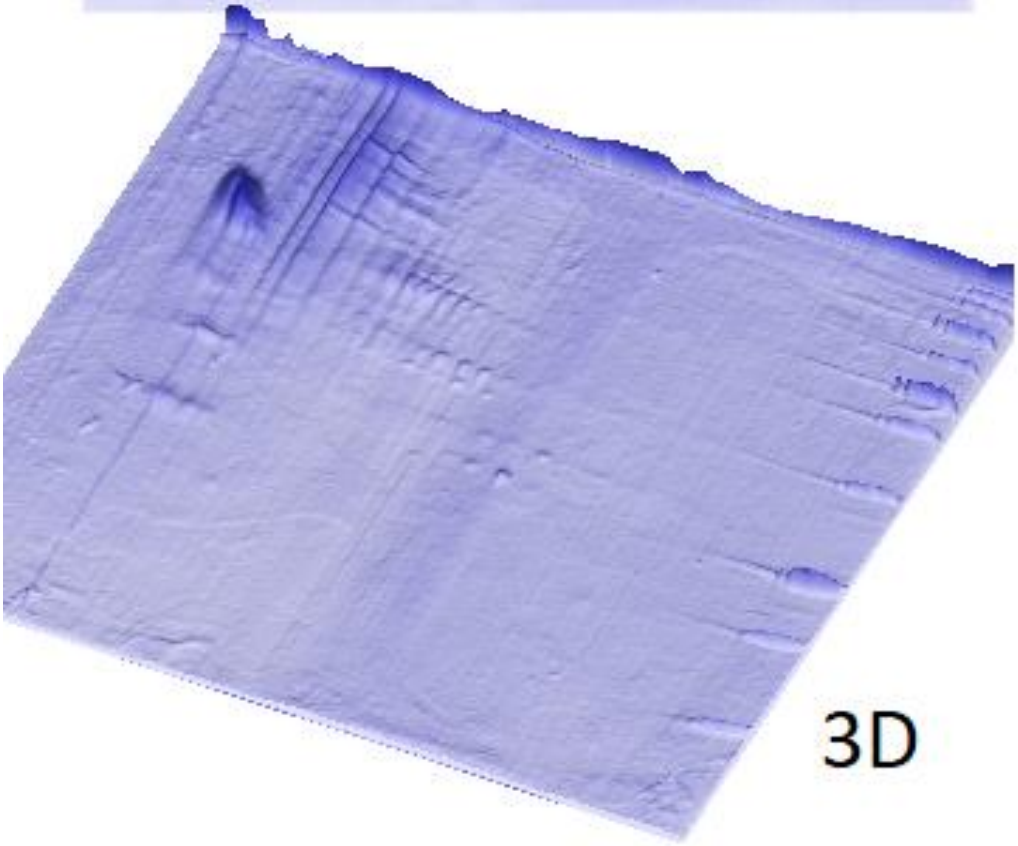
Мясо и бульон





Смесь (средняя проба)





Приложение 7

Экономическая эффективность

Затраты на оборудование для проведения протеомных исследований «Определение белкового профиля мяса или мясных продуктов методом двумерного электрофореза».

Данная статья содержит в себе затраты на приобретение, изготовление либо аренду инструментов, аппаратов, контрольно-измерительных приборов и прочих специальных устройств, необходимых для проведения исследований. В данном случае химическая посуда и оборудование для исследований не приобретались специально, а были арендованы на время работы.

Таблица 1– Расчет стоимости химической посуды

Посуда	Кол-во, шт.	Цена за единицу, руб.	Стоимость, руб.
1	**2**	**3**	**4**
Универсальная влагостойкая эластичная пленка парафильм	1	111,38	111,38
Рамки для сушки гелей (Gel drying frames size), размер 24 cm × 24 cm, фирма «Sigma» 50 штук/упак.	1	379,69	379,69
Шприцы Хамильтон (Hamilton® syringe 100,0 µL), фирма «Sigma»	1	909,57	909,57
Пробирки Эппендорф 1,5 мл с крышкой	10	1,27	12,70
Скальпель по ГОСТ 21240	1	200,00	200,00
Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 120262	1	2,00	2,00
Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,002 - 0,020 $см^3$	1	12 351,00	12 351,00
Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,020 - 0,200 $см^3$	1	12 351,00	12 351,00
Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,100 - 1,000 $см^3$	1	12 351,00	12 351,00
Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,500 - 5,000 $см^3$	1	3 923,00	3 923,00

1	2	3	4
Дозатор пипеточный переменного объема дозирования 0,500 - 5,000 $см^3$	1	3 923,00	3 923,00
Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 25 $см^3$	2	26,99	53,98
Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 50 $см^3$	1	29,10	26,99
Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 100 $см^3$	3	42,50	127,5
Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 200 $см^3$	1	44,00	44,00
Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 400 $см^3$	1	56,00	56,00
Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 800 $см^3$	1	97,00	97,00
Стаканы по ГОСТ 23932 типа В, исполнения 1, номинальной вместимостью 1000 $см^3$	1	136,07	136,07
Колбы конические по ГОСТ 25336 с делениями, типа ТС, исполнения 1, вместимостью 50 $см^3$	1	75,39	75,39
Колбы конические по ГОСТ 25336 с делениями, типа ТС, исполнения 1, вместимостью 100 $см^3$	7	103,75	726,25
Цилиндры мерные по ГОСТ 1770, 2 класс точности, вместимостью 25 $см^3$	1	109,02	109,02
Цилиндры мерные по ГОСТ 1770, 2 класс точности, вместимостью 50 $см^3$	1	84,99	84,99
Цилиндры мерные по ГОСТ 1770, 2 класс точности, вместимостью 100 $см^3$	1	138,87	138,87
Цилиндры мерные по ГОСТ 1770, 2 класс точности, вместимостью 250 $см^3$	1	184,99	184,99
Цилиндры мерные по ГОСТ 1770, 2 класс точности, вместимостью 500 $см^3$	1	289,99	289,99

Цилиндры мерные по ГОСТ 1770, 2 класс точности, вместимостью 1000 см3	1	435,00	435,00
1	**2**	**3**	**4**
Шприц, встроенная игла, модель 1710N, объем 100 мкл, калибр 22s (22s/51/2)	1	7767,00	7767,00
1651943 Иглы для нанесения на гель (Protean II xi 2-D, 2шт/уп), BioRad	1	7100,00	7100,00
Стекло для камеры VE-20; 20 см х 20 см; без выреза (2 шт/уп) Артикул: VE-20-G2 Производитель: Компания Хеликон	1	1632,00	1632,00
Стекло для камеры VE-20; 20 см х 20 см; с вырезом (2 шт/уп) Артикул: VE-20-GN2 Производитель: Компания Хеликон	1	2040,00	2040,00
Спейсер для камеры VE-3 и VE-20; материал: фторопласт (тефлон); толщина 1 мм (2 шт/уп) Артикул: VE-20-SF1.0 Производитель: Компания Хеликон	2	1194,00	2388,00
Гребенка для камеры VE-20; материал: фторопласт (тефлон); толщина 1 мм; 20 зубцов Артикул: VE-20-CF201.0 Производитель: Компания Хеликон	1	1194,00	1194,00
Стеклянные трубки для изофокусирования в амфолиновом градиенте, 180 см, фирма BIO-RAD Cat, No, 165-3136	1	10583,00	10583,00

Итого 80761,22

Арендная плата за пользование химической посудой рассчитывалась, исходя из стоимости посуды, 15 % амортизации и срока аренды – 1 день. Арендная плата = [(80761,22·0,15)/12]/30 = **33,65 руб.**

Таблица 2– Расчет стоимости химических реактивов

Материалы (реактивы)	Расход на анализ, г	Стоимость руб.	Сумма, руб.
1	**2**	**3**	**4**
N,N,N’,N’- Тетраметилэтилендиамин (N,N,Ń,Ń – Tetramethylenediamine) (ТЕМЕД) для электрофореза, с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %,фирмы «Sigma», 25мл	0,13	3203,90	16,66
Персульфат аммония (Ammoniumpersulfate) для электрофореза, с массовой долей основного вещества не менее 98,0%, фирмы «Panreac» 25г	0,01	5583,55	2,23
N,Ń .Метилен-бис-акриламид (N,Ń–Methylenebis(acrylamide) (МБА), с массовой долей основного вещества не менее 99,0%,фирмы «AppliChem», 50 г	0,16	2956,43	9,46
Трис (гидроксиметил) аминометан (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (Трис) сверхчистый, с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %, фирмы «Panreac», 500г	2,39	7893,21	37,73
Додецилсульфат натрия (Sodiumdodecylsulfate) (SDS) для электрофореза, с массовой долей основного вещества не менее 98,5 %, фирмы «Panreac», 250г	1,53	4282,98	26,21
2 – Меркаптоэтанол (2 – Mercaptoethanol), с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %,фирмы «Panreac», 100мл	3,50	2508,56	87,80
Акриламид (АА) 2К для электрофореза, с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %, фирмы «Panreac», 500 г	7,41	5432,92	80,52
Глицерин (Glycerol) для электрофореза, с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %, фирмы «Panreac», 1000 мл	10,00	10911,86	109,12
Глицин (Glycine) для электрофореза, с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %, фирмы «Panreac», 500 г	14,40	2374,60	68,39
Бромфеноловый синий (Bromphenol Blue sodiumsalt) с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %,фирмы «Panreac», 5 г	0,01	1926,83	3,85
Кумасси G-250, особой чистоты (Coomassie BrilliantBlue G -250) с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %, фирмы «Panreac», 25 г	1,00	8105,47	324,22
Мочевина для электрофореза (Urea) ,фирмы «Sigma», 1000 г	17,00	21314,78	362,35
Амфолины для изофокусирования (SERVALYT™ 5-7), фирмы «Serva», 25 мл	1,50	28014,81	1680,89

Амфолины для изофокусирования (SERVALYT™ 3-10), фирмы «Serva», 25 мл	0,78	28014,81	874,06
Тритон Х-100 (TritonX-100), фирмы «Sigma», 100 мл	1,15	5159,8	59,34
Ионообменная смола Амберлит (SERDOLIT MB-1), фирмы«Serva», 500 г	1,00	12168,50	24,34
1	**2**	**3**	**4**
Агароза (Agarose for electrophoresis), фирмы Sigma», 25 г	0,50	19112,5	382,25
Нитрат серебра (Silver nitrate), фирмы «Panreac», 100 г	0,40	20963,49	83,85
Тиосульфат натрия (Sodium Thiosulfate Pentahydrate), фирмы«Serva», 1000 г	0,004	2127,3	0,01
Карбонат натрия (Sodium carbonate), фирма «PanReac», 500 г	8,00	4155,56	66,49
Формальдегид (Formaldehyde - Solution 37 %), фирма «PanReac», 250 мл	0,23	2320,73	2,14
Спирт изопропиловый абсолютированный по ГОСТ 9805, 1000 мл	25,00	1131,49	28,29
Кислота ледяная уксусная по ГОСТ 61, 1000 г	20,00	246,13	4,92
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, 100 мл	10,00	250,00	25,00
Ортофосфорная кислота чда, 85%, 1л	0,34	535,00	0,18
Соляная кислота 37% (RFE, BP, Ph. Eur.), фарм., Panreac, 1л (1,19кг)	1,00	2049,04	2,05
Йодацетамид, BioUltra, 25 г	0,150	23 878,72	143,27
Дитиотреитол-ДЛ (ДТТ), для биохимии, AppliChem, 25 г	0,050	5165,00	10,33
Маркеры молекулярной массы белков PageRuler Plus, окрашенные, 10-250 kDa, 2 х 250 мкл	0,020	13628,00	1090,24

Сумма/на 6 пластин геля 5606,19, 1 образец 934,36

Временные затраты на проведение анализа 1 образца за 1 рабочий день

Таблица 3 – Расчет стоимости оборудования для анализов

Наименование оборудования и приборов	**Количество / единиц**	**Стоимость, руб.**
Высоковольтный источник тока PowerPac Universal, фирма BIO-RAD Cat, No, 164-5070	1	180529,00
Камера для электрофореза PROTEAN® II xi Cell, фирма BIO-RAD Cat, No, 165-1934	1	196333,00
Весы OHAUS AX 124 лабораторные аналитические	1	92164,00
pH-метр «ST3100-F», OHAUS	1	43390,50
Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры на уровне не менее 60 □С	1	16400,00
Камера «VE-20» для вертикального электрофореза на два геля	1	47940,00
Планшетный сканер для гелей Microtek Bio-5000 plus	1	504050,00

Центрифуга с охлаждением Eppendorf 5427R	1	493842,98
Устройство для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях	1	38 472,81
		1 613 122,29

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из стоимости оборудования, 15% амортизации и срока аренды – 1 месяц, Арендная плата = [(1613122,29·0,15)/12]·1 = 20164,03 руб.

На один анализ:

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из количества дней в месяце (30) и количества анализов в день (1),

Арендная плата = [(20164,03 /30)]/1 = 672,13 руб.

Таблица 4 – Суммарные затраты на проведение аналитических исследований «Получение двумерной электрофореграммы белков мяса или мясных продуктов»

№ п/п	Статьи затрат	Сумма, руб
1	Арендная плата за пользование химической посудой за 1 день	33,65
2	Стоимость химических реактивов на 1 анализ	934,36
3	Арендная плата за использование специального оборудования на 1 анализ	672,13
Итого, руб: 1640,38__		