بررسی امکان تشخیص آلودگی پودر ماهی به فرآورده های طیور، نشخوارکنندگان و اسب سانان بر اساس روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

علیرضا هروی موسوی- محمدرضا نصیری- غلامرضا پورسیفی- مهدی سلطانی - علی جوادمنش[1]

تاریخ دریافت ۸۵/۸/۱۰

چکیده

در ایران استفاده از پودر ماهی در تغذیه دام و طیور گسترش روز افزونی یافته است. هدف از انجام تحقیق حاضر، استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تشخیص آلودگی پودر ماهی به فرآورده های دام و طیور شامل بقایای گوسفند، گاو، اسب و طیور بود. برای انجام این آزمایش، ۱۰ نوع پودر ماهی موجود در بازار نمونه گیری شد. میزان نیتروژن نمونه ها با روش کجلدال اندازه گیری شد. استخراج DNA میتوکندریایی نمونه ها با روش فنل کلروفورم انجام گرفت و برای افزایش دقت تشخیص آلودگی احتمالی، نمونه هایی از خون مرغ، گاو و گوسفند به عنوان شاهد مثبت در آزمایش بکار گرفته شد. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز و بررسی قطعات حاصل از هضم آنزیمی، مشخص شد که تنها دو نمونه از ده نمونه پودر ماهی مورد استفاده، آلوده نبوده و سایر نمونه ها حداقل به یکی از گونه های مورد مطالعه آلوده بودند. از طرفی نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از درصد پروتئین خام برای ارزیابی کیفیت پودر ماهی کافی نبوده و با آزمونهای مبتنی بر PCR می توان آلودگی های احتمالی پودر ماهی را تشخیص داد. نتایج این آزمایش همچنین نشان دهنده ضرورت گنجاندن آزمونهای مبتنی بر PCR در استاندارد ملی ایران برای افزایش کیفیت محصولات تولید داخل است.

واژه های کلیدی: پودر ماهی، PCR، فرآورده های دام و طیور، تقلب

مقدمه

تشخیص بقایای بافتهای دامی در مواد خوراکی دامهای اهلی اهمیت روز افزونی یافته است. یکی از دلایل این اهمیت نقش احتمالی برخی از این بقایا در گسترش برخی بیماریها است. برای مثال از هنگامی که مصرف مواد آلوده توسط نشخوارکنندگان به عنوان مسیر اصلی انتقال بیماری جنون گاوی[1] (BSE) شناخته شد، قوانینی وضع گردید تا از ورود پودرگوشت و استخوان نشخوارکنندگان به زنجیره غذایی نشخوارکنندگان جلوگیری شود (۱۸ و ۲۰). یکی دیگر از دلایل اهمیت تشخیص بقایای بافتهای دامی در خوراك دام اهمیت تشخیص تقلبهای مواد خوراکی دامها است (۱۴).

در حال حاضر چند روش برای شناسایی بافتهای حیوانی در غذای حیوانات وجود دارد. بر مبنای دسته بندی ون هولست و همکاران این روشها عبارتند از: ۱- روش ریزبینی (میکروسکوپی) که بر اساس تشخیص بقایای استخوان مربوط به حیوانات است، ۲- روش میکروسکوپی فروسرخ[2] که بر اساس اندازه گیری طیف فرو سرخ هر یک از اجزای نمونه های غذایی می باشد، ۳- روش ELISA که مبتنی بر شناسایی آنتی ژنهای مخصوص هر گونه است ۴- روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) که بر اساس تعیین توالیهای DNA هدف است (۱۹). روش اول بر مبنای ارزیابی حسی نمونه بوده و خطای زیادی داشته و دقت آن پایین است. در روش دوم نیز هزینه های آزمایشگاهی بالا بوده و امکان انجام آن در سطح گسترده و وسیع مقدور نمی باشد. در مقایسه روشهای سوم و چهارم، می توان از جمله مزیتهای روش PCR نسبت به روش ELISA را در دقت بالا، انعطاف پذیری و عدم نیاز به نگهداری حیوانات آزمایشگاهی برای تولید آنتی بادی دانست (۶).

بیشتر مواد غذایی مورد استفاده در تغذیه دام فرایند حرارتی را گذرانده اند و این به معنای آسیب دیدن و تغییر DNA نمونه می باشد. با این حال، مطالعات انجام شده ثابت کرده اند علیرغم

۱- به ترتیب استادیاران، دانشجویان کارشناسی ارشد و گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

1) Bovine spongiform encephalopathy

2) Near Infrared Microscopy

تغییر DNA در طول فرایند حرارتی، DNA نسبت به پروتئینها از پایداری حرارتی بیشتری برخوردار است و می توان حتی با مقادیر بسیار کمی از DNA الگو، واکنش PCR را انجام داد (۱۷). برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ یک آزمایش PCR با توان شناسایی بافت نشخوارکنندگان در پودر گوشت و استخوان ابداع گردید (۱۶). در آزمایش های بعدی نشان داده شده است که واکنش PCR قادر به تشخیص بافت گونه های مختلف در خوراك دام است. در سال ۲۰۰۱، مایرز و همکاران با استفاده از پرایمرهای L۸۱۲۹ و H۸۳۵۷، DNA میتوکندریایی (mtDNA) با منشأ بافت گاوی را در نمونه های خوراك مورد مصرف نشخوارکنندگان ردیابی نمودند. نتایج این آزمایش نشان داد که این روش قادر به شناسایی حداقل ۰/۱۲۵ درصد پودر گوشت و استخوان در خوراك می باشد (۱۲). مطالعات بعدی برگر و همکاران (۴)، مایرز و همکاران (۱۴) و پفیفر و همکاران (۱۵) نیز نشان دادند با استفاده از PCR می توان بقایای دامی را تشخیص داد. مولر و همکاران (۲۰۰۶) با معرفی یک جفت پرایمر برای تکثیر قطعه ای از ژن 16s rRNA مسیر تشخیص آلودگیهای گونه ای را نیز مشخص کردند.

در ایران استفاده از پودر ماهی در تغذیه حیوانات گسترش روز افزونی یافته است و بر خلاف گذشته که استفاده از آن بیشتر محدود به صنعت طیور بود، امروزه به خصوص در جیره گاوهای شیری به صورت گسترده تری مورد استفاده قرار می گیرد. با افزایش تقاضا برای پودر ماهی، کارخانه های متعدد داخلی نیز به تولید آن پرداخته اند. گرچه در ایران هنوز نگرانی جدی نسبت به شیوع بیماریهایی چون جنون گاوی وجود ندارد، با این حال، یکی از نگرانی های دامداران، تشخیص محصول با کیفیت و عاری از هر نوع تقلب احتمالی از جمله آلودگی به بافت طیور و نشخوارکنندگان است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی امکان تشخیص آلودگی پودر ماهی به فرآورده های دام و طیور با استفاده از روشهای مبتنی بر PCR و DNA میتوکندریایی است.

مواد و روشها

نمونه گیری و اندازه گیری میزان نیتروژن نمونه ها: در این آزمایش، ۱۰ نمونه متفاوت از پودر ماهی های موجود در بازار متعلق به برخی واحدهای تولید کننده مورد استفاده قرار گرفت. با این فرض که میزان پروتئین موجود در پودر ماهی نمی تواند مشخص کننده نا خالصی های احتمالی باشد، میزان نیتروژن نمونه های گرفته شده با استفاده از روش کجلدال و توسط دستگاه (1030- Auto-analyzer, Tecator AB, Hoganas, Sweden) تعیین شد. برای بررسی میزان همبستگی بین درصد پروتئین خام و آلوده بودن یا نبودن پودر ماهی های مورد آزمایش، از نرم افزار آماری JMP (نسخه ۵/۱) استفاده شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA میتوکندریایی موجود در نمونه های گرفته شده، از روش فنل-کلروفورم و از کیت پرومگا (Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification System, Promega, Inc., Madison WI) استفاده شد. اجزای اصلی کیت عبارت بودند از: بافر لیز کننده برای تجزیه و هضم اجزای سلولی، آنزیم RNase A برای تجزیه RNA (جهت افزایش خلوص DNA)، محلول EDTA (0.5M PH 8.0)، بافر شوینده، و محلول شوینده هسته برای هضم، شستشو و جداسازی هیستون ها و سایر ضمایم هسته ای غیر DNA. استخراج DNA بر مبنای دستورالعمل متعلق به کیت انجام گرفت. پس از پایان استخراج، DNA به دست آمده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد تا از کمیت و کیفیت DNA استخراج شده اطمینان حاصل شود.

واکنش PCR: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طیور، نشخوارکنندگان (گاو، گوسفند و بز) و اسب سانان برای بررسی آلودگی احتمالی نمونه های پودر ماهی به گونه های فوق و توسط دستگاه ترموسایکلر (T personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR برای پرایمرهای مختلف بصورت زیر بود: از پرایمرهای اختصاصی طیور، اسب سانان (۱۳) و نشخوارکنندگان (CB7u و pMol(CB71 ۱۰ (۴میکرولیتر)، آب دو بار تقطیر (۵ میکرولیتر)، PCR diluents (۱۰ میکرولیتر) و DNA الگو ۲۰ نانوگرم (۵ میکرولیتر). توالی پرایمرهای مورد استفاده (۴) در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول(۲) برنامه حرارتی واکنش PCR را در مورد هر یک از پرایمرها نشان می دهد. تعداد چرخه برای واکنش های مختلف PCR، ۳۵ بود و در این آزمایش DNA استخراج شده از خون مرغ، گاو و گوسفند به عنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.