چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005
مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

شناسايي تقلبات قصابي ها به كمك تعيين جنسيت لاشه گاو توسط PCR

آرش جوانمرد[1]**، علي جوادمنش**[2]*
[1] پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي شمالغرب و غرب كشور، تبريز
[2] گروه علوم دامي دانشگاه فردوسي مشهد-۰۹۱۱۳۷۱۶۰۴۸
Email: javanmard@azaran.org.ir
alijavadmanesh@yahoo.com

چكيده

از جمله عمده ترين مسائل جهاني در ارتباط با بازاريابي، فروش و صادرات گوشت، همانا كيفيت گوشت توليدي و مطابق با ذائقه هاي مختلف مصرف كنندگان مي باشد. در قرن اخير، صنعت پرورش و توليد حيوانات گوشتي به سوي توليد گوشت بدون چربي، توليد بيشتر و نتيجتاً افزايش گوشتهاي مطبوع و حاوي تردي كافي حركت مي كند. گوشت حيوان نر از ارزش اقتصادي بالاتري نسبت به حيوان ماده برخوردار است زيرا حيوانات ماده عمدتا به منظور توليد مثل نگهداري مي شود و طبيعاً ذبح آنها زماني صورت مي پذيرد كه داراي سن بالايي مي باشند، بنابراين گوشت آنها فاقد كيفيت مطلوب مي باشد. موضوع اين پژوهش استفاده از روشهاي مولكولي تعيين جنسيت قطعات گوشت عرضه شده در قصابي ها و بررسي صحت ادعا نسبت به فروش گوشت حيوان نر به مشتري مي باشد. نمونه هاي قطعات گوشت از ۱۰ قصابي در سطح استان (سه نمونه از هر مغازه) به طور تصادفي اخذ گرديده و استخراج DNA به كمك روش بوم و همكاران (۱۹۹۰) و واكنش زنجيره پلي مراز (Polymerase Chain Reaction) جهت تكثير قطعه ۳۰۷ جفت بازي از ناحيه اي واقع در كروموزوم Y به نام جايگاه BRY1 گاوي انجام گرفت. نتايج حاصل از بررسي نشان داد كه در ۷۰ درصد مواقع عرضه كنندگان گوشت از صداقت لازم درمورد فروش گوشت حيوان نر به مشتري برخوردار نبودند.

كلمات كليدي: تعيين جنسيت، واكنش زنجيره پلي مراز ، گوشت گاو

Detection of butchers fraud in meat markets with bovine carcass sex determination by means of PCR

Abstract

Meat of male animals is commercially more valuable than female animals, because females kept for reproduction and normally slaughtered in older age, when the length and rigidity of muscle fibers is increased and the level of collagen is higher resulting in tougher meat and lower quality therefore lower commercial value. Many meatpacking sells cow's meat as male meat, causing damage to various meat producing sectors and consumers. The objective of this study is to develop a technique that would permit the sexing of boned, packaged and chilled, ready for sale beef. Principle of this technique is the same as used for sexing preimplanted cattle embryos, and depends on the fact that males and females can be differentiated by amplification of a male-specific region of chromosome Y using PCR. The amplified male-specific DNA region was a 307 bp fragment from the BRY1 region. Genomic DNA was extracted by the Guanidinium-thiucianat method. DNA was quantified in a spectrophotometer at 260nm and its integrity was determined on 1.8% agarose gel. We analyzed 30 samples identified as belonging to males, 9 of which (30%) presented a discordant result, i.e., they actually belonged to females. This method was a cheap and very efficient for determination of cattle sex from the carcass. It is technically simple and rapid, permitting its utilization in the prevention of fraud in the commercialization of beef.

Key words: Sex determination, Polymerase chain reaction, Meat

مقدمه

از جمله عمده ترين مسائل جهاني در ارتباط با بازاريابي، فروش و صادرات گوشت، همانا كيفيت گوشت توليدي و مطابق با ذائقه هاي مختلف مصرف كنندگان مي باشد. در حال حاضر، صنعت پرورش و توليد حيوانات گوشتي به سوي توليد گوشت بدون چربي، توليد بيشتر و نتيجتاً افزايش گوشتهاي مطبوع و حاوي تردي كافي، حركت مي كند. امروز توجه به تردي گوشت(Meat tenderness) از مواردي است كه همواره شركتهاي تجاري را در يافتن راهكارهاي مناسب در جهت ارتقا اين خصوصيت، به رقابت واداشته است. از مشكلات كنوني در اين رابطه، فقدان روش طبقه بندي صحيح لاشه، بر اساس تردي نهايي گوشت مي باشد. از جمله پارامترهايي كه قبل از ذبح دامهاي اهلي، بر تردي و كيفيت گوشت موثر مي باشد، مي توان به تغديه، استرس، ژنتيك، جنس، مديريت اشاره كرد و از جمله فاكتورهايي كه پس از ذبح حيوان با تردي و كيفيت گوشت نهايي مرتبط هستند، مي توان زمان پيري پس از جمود نعشي، تحريك پذيري الكتريكي ماهيچه، pH ، لرزش ماهيچه در موقع ذبح، مقدار رگ وپي، دفعات انجماد و ذوب گوشت و بالاخره روشهاي پخت گوشت را نام برد(اشلي و همكاران ۱۹۹٤). معمولا گوشت دام نر از ارزش اقتصادي بالاتري نسبت به دام ماده برخوردار است چرا كه دام ماده به منظور توليد مثل پرورش داده مي شود و طبيعتا ذبح آن در ۷ الي ۸ سالگي صورت مي پذيرد يعني زماني كه ضخامت فيبرهاي ماهيچه اي افزايش يافته و سطح كلاژن بالايي را برخورد دار مي باشد. امروزه با استفاده از واكنش زنجيره اي پليمراز مي توان به سهولت گوشت مربوط به حيوانات ماده و نر را از هم تشخيص داد(ايتاگاكي وهمكاران۱۹۹۳). اين روش تنها روش براي تعيين جنسيت جنين در مراحل اوليه نمو نيز مي باشد. موضوع تحقيق فوق استفاده از تكنيك ساده براي تعيين جنسيت قطعات گوشت عرضه شده در قصابيها و ارزيابي صداقت فروشنده مبني بر نر بودن حيوان ذبح شده مي باشد.

مواد و روشها

نمونه گيري و استخراج DNA

تعداد ۳۰ قطعه گوشت متعلق به ده مغازه عرضه گوشت در سطح استان بطور تصادفي انتخاب و اقدام به بيوپسي گرديد. نمونه ها در فلاسك حاوي يخ در همان روز به آزمايشگاه انتقال داده شد و كاملا و به طور مجزا چرخ گرديد و سپس با استفاده از ازت مايع هموژن شد. سپس ۲۰۰ ميلي گرم از هر نمونه توزين و به داخل ميكروتيوب منتقل و آماده استخراج شد. استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از روش گوانيدين-تيوسيانات (بوم و همكاران ۱۹۹۰) و با استفاده از كيت Diatom انجام گرفت جهت تعيين غلظت نمونه هاي استخراج DNA شده، از روش الكتروفورز مقايسه اي آگارز با استفاده از مقادير مشخصي DNA فاژ لامبدا استفاده گرديد.

انتخاب آغازگرها

توالي آغازگرهاي مورد استفاده بر اساس تحقيق Matthew و همكاران (۱۹۹۰) انتخاب شد كه قطعه اي بطول ۳۰۷ جفت باز از ناحيه اختصاصي مربوط به جنس نر[1] به نام لوكوس BRY1 گاوي را تكثير مي نمايند. اين قطعه در گاو نر موجود مي باشد و قابل تكثير است ولي در جنس ماده وجود ندارد.

توالي رفت: 5′ -**GGATCCGAGAGACACAGAACAGGCTGC** - 3′
توالي برگشت: 5′ - **TTGATCAAGCTAATCCATCCATCCTAT**- 3′

واكنش زنجيره‌اي پليمراز (PCR)

انجام واكنش زنجيره اي پليمراز به كمك كيت PCR Universal (Iso Gene–Moscow) كه حاوي Mix، PCR Diluent و روغن معدني بود بروش استاندارد انجام گرفت. غلظت نهايي مواد در حجم ۲۵ ميكروليتر عبارت بودند از: يک واحد آنزيم *تك* پليمراز، ۲۰۰ ميكرومول از هر dNTP، ۲ ميلي مول MgCl2، ۲۰-۱۰ پيكامول مخلوط پرايمرها، ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA و بافر استاندارد. واكنش واكنش زنجيره پلي مراز با برنامه حرارتي زير به تعداد ۳۵ سيكل در دستگاه ترموسايكلر بيومترا (Biometra) انجام شد. برنامه حرارت واكنش زنجيره پلي مراز ي عبارت بود از: ۰۹ درجه سانتيگراد جهت واسرشته شدن DNA بمدت ٦۰ ثانيه، ۸۵ درجه سانتيگراد جهت اتصال پرايمرها بمدت ۳۰ ثانيه و دماي ۷۲ درجه سانتيگراد جهت سنتز بمدت ۱ دقيقه.

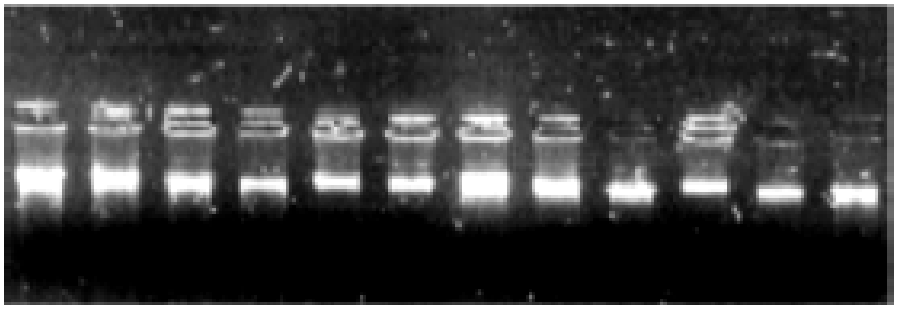
الكتروفورز

جهت مشاهده محصولات واكنش زنجيره پلي مراز از ژل آگارز ۱/۸ % و ولتاژ ۱۰۰-۷۰ ولت بمدت ۲ ساعت استفاده شد. رنگ آميزي ژل با اتيديوم بروماید (۱۰ mg/ml) انجام گرفت. قطعه تكثير شده توسط اشعه ماورا بنفش با طول موج ۲۳۰ نانومتر مشاهده و عكسبرداري توسط دستگاه ژل داكيومنتيشن (Biometra)صورت گرفت.

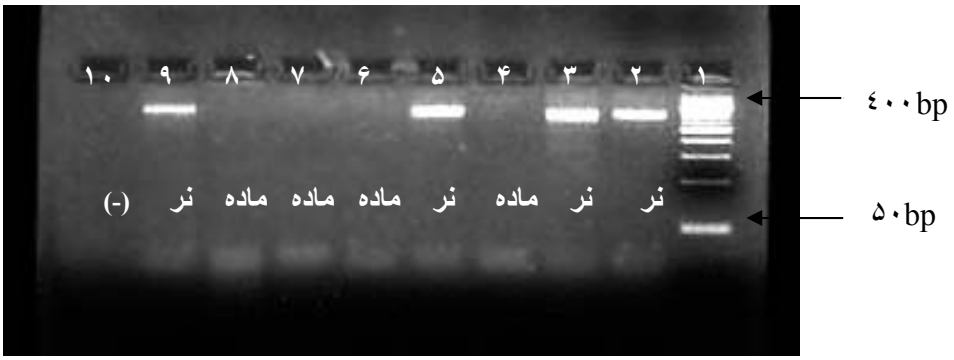
نتايج و بحث

استفاده از روش بوم و همكاران براي استخراج DNA از نمونه گوشت راندمان خوبي را در استحصال DNA نشان داد(شكل ۱). واكنش زنجيره پلي مراز نيز با موفقيت انجام پذيرفت و قطعه ۳۰۷ جفت بازي مورد نظر، در نمونه هاي مربوط به جنس نر بدون قطعه غير اختصاصي تكثير گرديد(شكل ۲). از ۳۰ نمونه مورد آزمايش، ۹ مورد مربوط به جنس ماده بودند (جدول ۱). همچنين از ۱۰ مغازه تحت آزمايش، ۷ مورد فاقد صداقت لازم با مشتري تشخيص داده شدند. روشهاي مولكولي مبتني بر PCR داراي دقت بسياربالايي مي باشند بنابراين از آنها مي توان در تشخيص جنسيت، با دقت بسيار بالا استفاده كرد. نتايج آزمايش نشان داد كه از كل نمونه هاي مورد بررسي ۳۵ درصد گوشت ماده و بقيه گوشت نر تشخيص داده شد و در ۷۰ درصد موارد (۷ فروشنده از ده مورد) فروشندگان گوشت از صداقت لازم با مشتريان برخوردار نمي باشند و عدم صداقت در عرضه گوشت يكي از مشكلات بالقوه خريداران مي باشد.

[1] *Male specific region*



تصویر شماره ۱: کمیت و کیفیت *DNA* تخلیص شده از گوشت



تصویر شماره ۲: قطعه۳۰۷ جفت باز تکثیر شده از لوکوس*BRY1* بوسیله واکنش زنجیره پلي مراز شماره هاي ۲، ۳، ۵ و ۹ مربوط به حیوانات نر مي باشند. شماره ۱۰ نیز کنترل منفي است. مارکر وزني(M50 bp)از بالا به پایین داراي قطعات ۵۰۰، ۴۵۰، ۴۰۰، ۳۵۰، ۳۰۰، ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ جفت بازي مي باشد.

جدول ۱: تعداد نمونه هاي اخذ شده از قصابي هاي مختلف و نتایج بررسي

منطقه	تعداد نمونه هاي موردبررسي		
	تعدادکل	تعدادنر	نتایج حاصل ازPCR
تبریز	۳	۱	
خسرو شهر	۳	۳	
ایلخچي	۳	۲	
اهر	۳	۳	
سردرود	۳	۲	
میانه	۳	۱	
اذرشهر	۳	۲	
بناب	۳	۳	
مراغه	۳	۲	
بستان اباد	۳	۲	
تعداد کل	۳۰	۲۱	

REFERENCES

-Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M. E. & van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. Journal of Clinical Microbiology 28, pp. 495–503.
- Itagaki, Y. 1993. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. J. Reproduction Development, Vol. 39(1) P: 65-72.
- Schlee, P. et al.1994. Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. J of Theoretical and Applied Genetics. Vol. (88), P: 497-500.