جمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
3-5 آذر ماه 1386، سالن اجلاس سران
The 5th National Biotechnology Congress of Iran
24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

تشخیص تقلب در سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده با استفاده از روش Multiplex PCR

قوّتی رودسری شاهرخ***[1]، افتخاری شاهرودی فریدون[1]، میرحسینی سید ضیاء الدین[2و3] نصیری محمد رضا [1]، هروی موسوی علیرضا[1] و جواد منش علی[1]

1- قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد. صندوق پستی 1163-91775 Ghovvati@yahoo.co.uk

2- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور

3- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

چکیده

شناسایی گونه‌های حیوانی استفاده شده در فرآورده‌های پروتئینی مورد مصرف انسان به لحاظ اقتصادی، عقاید مذهبی و بهداشتی بسیار حائز اهمیت می باشند. هدف از این تحقیق تشخیص وجود تقلب و شناسایی گونه‌های استفاده شده (نشخوارکنندگان، طیور و خوک سانان) در سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده با استفاده ازروش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز بود. بدین منظور از سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده به ترتیب تعداد 10 نمونه متعلق به شرکت های مختلف جمع آوری شد. استخراج DNA از نمونه ها به روش گوانیدین تیوسیانات- سیلیکاژل صورت گرفت. قطعات 104، 183 و 290 جفت بازی به ترتیب برای نشخوار کنندگان (گاو، گوسفند و بز)، طیور (مرغ و بوقلمون) و خوک سانان (اهلی و وحشی) از نواحی ژنی 12s rRNA و 16s rRNA، DNA میتوکندری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز به صورت Multiplex و آغازگرهای اختصاصی نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان تکثیر شدند. نتایج نشان دادند که نمونه‌های سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده جمع آوری شده هیچگونه آلودگی به بقایای بافتی خوک سانان نداشتند. اما 80 درصد نمونه های سوسیس و90 درصد نمونه های کالباس آلودگی به بقایای بافتی طیور را نشان دادند. همچنین نمونه های گوشت چرخ کرده نیز عاری از آلودگی به بافت طیور بودند.

کلمات کلیدی: تشخیص تقلب، DNA میتوکندری، فرآورده های پروتئینی، سوسیس، کالباس و Multiplex PCR.

مقدمه

خریداران نیاز به اطلاعات شفاف و دقیق جهت خرید مواد غذایی دارند. که بر اساس شیوه و سبک زندگی، مذهب و سلامت عمومی مواد غذایی مورد نیاز خود را خریداری می نمایند (11). تشخیص گونه های استفاده شده در مواد غذایی از نظر کنترل برخی از بیماری ها اهمیت ویژه ای دارد که در این بین بیماری های مغزی عصبی کشنده و قابل انتقال (TSEs)[1] در طی چند سال اخیر اهمیت زیادی پیدا نموده اند (8). بر مبنای دسته بندی ون هولست و همکاران (10 و 9) پنج روش برای تشخیص ناخالصی ها در مواد غذایی صنعتی فرآوری شده و خوراک دام و طیور در آزمایشگاه ها و مراکز تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرند که شامل: 1- روش ریزبینی (میکروسکوپی)، 2- روش طیف سنجی فروسرخ[2]، 3- روش ELISA، 4- روش کروماتوگرافی مایع (HPLC)[3] و 5- روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) که بر اساس تعیین توالیهای DNA هدف است. از مزیتهای روش PCR نسبت به سایر روش ها می توان دقت فراوان، سرعت زیاد، حساسیت بالا و انعطاف پذیری این روش نسبت به سایر روشها اشاره کرد (7). برای نخستین بار چیکونی[4] (1994) از روش PCR جهت شناسایی تقلب در گوشت و فرآورده های گوشتی جانوران اهلی استفاده نمود و سپس فی[5] و همکاران در سال 1996 نیز این روش را مورد ارزیابی قرار دادند(6 و4). بوترو[1] و همکاران (2003) با استفاده

---

[1] . Transmissible spongiform encephalopathies
[2] . Near Infrared Microscopy
[3] . High-performance liquid chromatography
[4] . Chikuni
[5] . Fei

از نواحی 12s rRNA و 16s rRNA از DNA ژنومی میتوکندری نسبت به طراحی آغازگرهایی به صورت Multiplex جهت بررسی و شناسایی تقلب در فرآورده های لبنی اقدام نمودند. این افراد تکنیک Multiplex PCR را روشی حساس و قابل اعتماد نسبت به سایر تکنیکهای رایج PCR و اثبات وجود تقلب در مواد غذایی و خوراک دام و طیور فقط با استفاده از یک واکنش PCR عنوان نمودند. همچنین آنها بر صحت نتایج حاصله و حساسیت و دقت بالای این روش بسیار تأکید نمودند (3). هدف اصلی از این تحقیق توسعه و بهینه نمودن Multiplex PCR از نواحی ژنی 12s rRNA و 16s rRNA برای تشخیص نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان در سوسیس و کالباس بود. به کمک این روش می توان گونه های حیوانی استفاده شده در سایر مواد غذایی را از یکدیگر متمایز نمود.

مواد و روشها

پس از هموژن نمودن نمونه ها با ازت مایع، خارج نمودن روغن و چربی از سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده با استفاده از متانول- کلروفورم و آب با نسبت (0/8 : 1: 2) انجام شد. استخراج DNA از نمونه ها به روش گوانیدین تیوسیانات – سلیکاژل (بوم[2] و همکاران 1990) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش نورسنجی[3] تعین شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نشخوار، طیور و خوک سانان (5) ذکر شده در جدول-1 برای بررسی آلودگی احتمالی نمونه های سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده به گونه های فوق توسط دستگاه ترموسایکلر (T personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی 50 میکرولیتر و غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود:(100 mM Tris-HCl (pH 8.8 ، 1/5 U آنزیم *Taq* پلیمراز، 0/1 میلی گرم بر میلی لیتر BSA، 0/4 mM از هر dNTP، 2/5 mM از $MgCl_2$، 20، 20 و 5 پیکامول به ترتیب از آغازگرهای نشخوارکنندگان، طیور و خوک سانان و 200 نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی زیر و در 35 سیکل تکثیر شدند: 94 درجه سانتی گراد برای 10 دقیقه، 94 درجه سانتی گراد برای 30 ثانیه، 60 درجه سانتی گراد برای 50 ثانیه، 72 درجه سانتی گراد برای 1 دقیقه و 72 درجه سانتی گراد برای 10 دقیقه. محصولات PCR بر روی ژل آگارز 2٪ به مدت 60 دقیقه و با ولتاژ 90 ولت الکتروفورز شده و ژل مربوطه پس از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید برای بررسی محصولات توسط اشعه ماورای بنفش بررسی شد.

نتایج و بحث

نتایج نورسنجی نشان داد که DNA های استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار هستند. الگوی باندی مربوط به کنترل مثبت استفاده شده در این آزمایش تأیید کننده اختصاصی بودن باندهای حاصل از آغازگرهای اختصاصی نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان است. از طرفی عدم مشاهده باند درکنترل منفی نشان دهنده دقت و صحت نتایج آزمایش است. در الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR با آغازگرهای اختصاصی خوک سانان در نمونه های مورد آزمایش هیچگونه باندی مشاهده نشد می توان نتیجه گرفت که در هیچ یک از نمونه های سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده مورد استفاده در این آزمایش، قطعه ای تولید نگردیده است و لذا نتیجه گیری می شود که هیچ یک از نمونه های مورد آزمایش، به بافت خوک سانان آلوده نبودند. اما در

---

[1] . Bottero
[2] . Boom
[3] . Spectrophotometric method

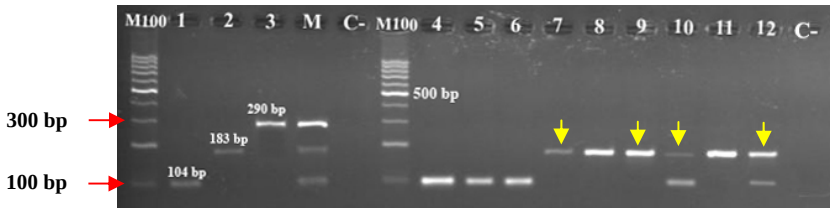
مجموع در 8 نمونه سوسیس و 9 نمونه کالباس آلودگی به بقایی بافتی طیور مشاهده گردید که در شکل-1 مشخص گردیده است. همچنین نمونه های گوشت چرخ کرده نیز عاری از آلودگی به بافت طیور بودند. سه ناحیه DNA ژنومی، DNA میتوکندریایی و RNA به عنوان نشانگرهایی بالقوه برای توالی های DNA، امکان شناسایی و تمایز بین گونه ها را ممکن کرده اند (1). از آنجاییکه DNA میتوکندریایی و RNA نسخه های زیادی به ازای هر سلول دارند، مولکول های مناسبی برای آزمونهای تشخیصی با روش PCR می باشند (1). نتایج حاصله نشان دهنده ضرورت گنجاندن آزمون های مبتنی بر PCR در استاندارد ملی ایران برای افزایش کیفیت فرآورده های پروتئینی است. که برای این منظور روش Multiplex که در این تحقیق استفاده و بهینه شد می تواند جهت کنترل مواد غذایی به لحاظ بررسی تقلب مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از قطب علمی علوم دامی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد، و همچنین آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور (رشت) صمیمانه تشکر می شود.

جدول-1 توالی آغازگرهای اختصاصی گونه

آغازگرها	گونه های تشخیصی	توالی آغازگر ها	قطعات تولیدی (جفت باز)
Ruminant	گاو،گوسفند و بز	5′ GAA AGG ACA AGA GAA ATA AGG 3′ 5′ TAG GCC CTT TTC TAG GGC A 3′	104
Poultry	مرغ و بوقلمون	5′ TGA GAA CTA CGA GCA CAA AC 3′ 5′ GGG CTA TTG AGC TCA CTG TT 3′	183
Pork	خوک و گراز	5′ CTA CAT AAG AAT ATC CAC CAC A 3′ 5′ ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT 3′	290



شکل-1- الکتروفورز محصولات Multiplex PCR. شماره 1 (DNA گاو)، شماره 2 (DNA مرغ)، شماره 3 (DNA خوک)، MU ◄ Multiplex PC، C- ◄ کنترل منفی، شماره 6- 4 (نمونه های گوشت چرخ کرده)، شماره 9- 7 (نمونه های سوسیس)، شماره 12- 10 (نمونه های کالباس)، M100 نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (1000-900-800-700-600-500-400-300-200-100).

منابع

1. Bellis, C., K. J. Ashton, L. Freney, B. Blair, and L. R. Griffiths. (2003) A molecular genetic approach for forensic animal species identification. Forensic Sci. Int. 134: 99-108.
2. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim, and. J. Vandernoordaa. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.
3. Bottero, M. T., A. Dalmasso, D. Nucera, R. M. Turi, S. Rosati, S. Squadronne, M. Goria, and T. Civera. (2003) Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. Food Prot. 66: 2307-2312.
4. Chikuni, K., T. Tabata, M. Kosugiyama, M. Monma, and M. Saito. (1994) Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. Meat Sci. 37: 337-345.

5. Dalmasso, A., E. Fontanella, P. Piatti, T. Civera, S. Rosati, and M. Bottero. (2004) A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol. Cell. Probes. 18: 81-87.
6. Fei, S., T. Okayama, M. Yamanoue, I. Nishikawa, H. Mannen, and S. Tsuji. 1996. Species identification of meats and meat products by PCR. Animal Science and Technology (Jpn). 67: 900-905.
7. Gizzi, G., L. W. D. van Raamsdonk, V. Baeten, I. Murray, G. Berben, G. Brambilla, and C. von Holst. (2003) Risk analysis of prion diseases in animals - An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding BSE. Rev. Sci. of. Int. Epiz. 22(1): 311-331.
8. Muldoon, M. T., O. V. Dale, M. C. Brown, and J. W. Stave. (2004) Targets and methods for the detection of processed animal proteins in animal feedstuffs. Int. Food Science and Technology. 39: 851-861.
9. von Holst, C., A. Boix, V. Baeten, J. Vancutsem, and G. Berben. (2006) Determination of processed animal proteins in feed: the performance characteristics of classical microscopy and immunoassay. Food Addit Contam. 23: 252-264.
10. Von Holst, C., V. Baeten, G. Berben, and G. Brambilla. (2004) Overview of methods for the detection of species specific proteins in feed intended for farmed animals Status. European Communities.
11. Woolfe, M., and Primrose, S. (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. TRENDS in Biotechnology. 22(5): 222-226.

Fraud detection in sausages, cold cut and ground meat by Multiplex PCR method

Ghovvati***[1], S., F. E. Shahroudi[1], S. Z. Mirhoseini[2], M. R. Nassiri[1], A. H. Moussavi[1], & A. Javadmanesh[1]

1. Excellence Center in Animal Science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad,

Mashhad, Iran P.O.Box: 91775-1163 Ghovvati@yahoo.co.uk

2. Biotechnology Research Institute, North of Iran

Abstract

The identification of animal species used in meat products is very important in respect to economic, religion and sanitarily. The object of this study was the identification of cheating and the animal species (Ruminant, Poultry and Pork) used in food by PCR method. Samples were collected from ground meat (10 samples), sausages (10 samples) and cold cut (10 samples) from different companies. DNA extraction was done based on the guanidinium thiocianate-silicagel method. In a multiplex PCR reaction three fragments of 104, 183 and 290 bp from ruminants (cattle, sheep and goat), poultry (chicken and turkey) and porcine (wild and domestic) were amplified with specific primers. These fragments belonged to mitochondrial 12s rRNA and 16s rRNA. The results demonstrated that none of the samples (ground meat, sausage and cold cut) were contaminated with porcine residuals but 80% of sausage samples and 90% of cold cut samples were contaminated with poultry residuals. Also the ground meat samples were not contaminated with poultry residuals.

Key words: Cheating identification, Mitochondrial DNA, Meat products, Sausage, Cold cut and Multiplex PCR.