شناسایی و ردیابی بقایای بافتی اسب سانان در مواد غذایی و خوراک دام و طیور با استفاده از توالی Cytochrome-b

شاهرخ قوتی[۱و۲]، محمد رضا نصیری[۱]، سید ضیاء الدین میرحسینی[۳و۲]، علیرضا هروی[۱]، علی جواد منش[۱]، مهدی سلطانی[۱]، پوریا حسن نیا[۴] و محمد دوستی[۱]

۱- قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فرودوسی مشهد. صندوق پستی ۱۱۶۳-۹۱۷۷۵ Ghovvati@yahoo.co.uk

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور

۳- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۴- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده

با توجه به شرایط کنونی و رشد چشمگیر علم ژنتیک و بویژه تکنیک های مولکولی به آسانی می توان بسیاری از تخلفات و تقلبات خاموش در مواد غذایی و خوراک دام و طیور را شناسایی و تفکیک نمود. هدف از این تحقیق شناسایی و ردیابی بقایای بافتی گونه‌های اسب سان (اسب و الاغ) در مواد غذایی و خوراک دام و طیور با استفاده از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز بود. بدین منظور از سوسیس، کالباس، گوشت چرخ کرده وپودر ماهی تولید کارخانه های مختلف به‌ترتیب تعداد ۱۰، ۱۰، ۱۰ و ۵۰ نمونه جمع آوری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش گوانیدین تیوسیانات- سیلیکاژل صورت گرفت. قطعه ۱۴۴ جفت بازی از ناحیه Cytochrome-b توالی DNA میتوکندری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز و جفت آغازگر اختصاصی اسب سانان تکثیر شد. نتایج نشان دادند که نمونه های جمع آوری شده هیچگونه آلودگی به بقایای بافتی اسب سانان نداشتند.

واژه های کلیدی: اسب سانان، ، مواد غذایی، خوراک دام و طیور، Cytochrome-b، DNA میتوکندری.

بکارگیری روش PCR رقابتی به منظور بررسی کمی ضایعات طیور در پودر ماهی

فرج الهی، ه.، ع. ا. اسلمی نژاد.، م. ر. نصیری.، م. ه. سخاوتی.، ع. جوادمنش

دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

ضایعات کشتارگاهی طیور از جمله شایعترین تقلبات در پودر ماهی به منظور افزایش درصد پروتئین آن می باشد. بدین منظور از توالی 12s rRNA طیور به عنوان DNA هدف در نمونه های پودر ماهی استفاده شد. بعد از انجام PCR با پرایمر اختصاصی طیور برای نمونه های شاهد منفی هیچ گونه باندی مشاهده نشد. تحلیل نتایج PCR رقابتی با استفاده از نرم افزارهای ImageJ و JMP نشان داد که درصد آلودگی در بین نمونه ها در محدوده ۰/۱۳٪ تا ۳٪ بود و میزان R^2 در نمودار استاندارد برای نمونه های مختلف در محدوده ۰/۷۵ تا ۰/۹۹ بود. این مطالعه در ایران اولین گزارش در ارتباط با بکارگیری روش PCR رقابتی در بررسی کمی تقلبات در مواد غذایی و خوراک دام و طیور می باشد.

واژه های کلیدی: PCR رقابتی، پودر ماهی، ناخالصی طیور

شناسایی و ردیابی بقایای بافتی اسب سانان در مواد غذایی و خوراک دام و طیور

با استفاده از توالی Cytochrome-b

شاهرخ قوّتی[۱و۲]، محمد رضا نصیری[۱]، سید ضیاء الدین میرحسینی[۲و۳]، علیرضا هروی[۱]، علی جواد منش[۱]، مهدی سلطانی[۱]، پوریا حسن نیا[۴] و محمد دوستی[۱]

۱- قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فرودوسی مشهد. صندوق پستی ۱۱۶۳-۹۱۷۷۵

Ghovvati@yahoo.co.uk

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور

۳- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۴- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده

با توجه به شرایط کنونی و رشد چشمگیر علم ژنتیک و بویژه تکنیک های مولکولی به آسانی می توان بسیاری از تخلفات و تقلبات خاموش در مواد غذایی و خوراک دام و طیور را شناسایی و تفکیک نمود. هدف از این تحقیق شناسایی و ردیابی بقایای بافتی گونه‌های اسب سان (اسب و الاغ) در مواد غذایی و خوراک دام و طیور با استفاده از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز بود. بدین منظور از سوسیس، کالباس، گوشت چرخ کرده وپودر ماهی تولید کارخانه های مختلف به ترتیب تعداد ۱۰، ۱۰، ۱۰ و ۵۰ نمونه جمع آوری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش گوانیدین تیوسیانات- سیلیکاژل صورت گرفت. قطعه ۱۴۴ جفت بازی از ناحیه Cytochrome-b توالی DNA میتوکندری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز و جفت آغازگر اختصاصی اسب سانان تکثیر شد. نتایج نشان دادند که نمونه های جمع آوری شده هیچگونه آلودگی به بقایای بافتی اسب سانان نداشتند.

واژه های کلیدی: اسب سانان، ، مواد غذایی، خوراک دام و طیور، Cytochrome-b، DNA میتوکندری.

مقدمه

شناسایی گونه‌های حیوانی استفاده شده در فرآورده‌های پروتئینی مورد مصرف انسان و خوراک دام و طیور به لحاظ اقتصادی، عقاید مذهبی و بهداشتی بسیار حائز اهمیت می باشند(۳و۴). بیماری‌هایی چون جنون گاوی و آنفولانزای مرغی، سوء استفاده بعضی تولیدکنندگان مواد غذایی، دلایل مذهبی، حساسیت‌ها (آلرژی‌های) غذایی و غذاهای ترانس ژنتیک (GMOs)[۱] باعث افزایش نگرانی مردم در خصوص ترکیبات محصولات غذایی شده است(۲و۵). گاهی اوقات برچسب محصولات غذایی تضمین کافی و درستی را از ترکیب واقعی خوراکها نمی‌دهند، لذا لازم است روش‌هایی برای تعیین و تصدیق ترکیبات خوراک وجود داشته باشد تا هم مصرف کنندگان و هم تولید کنندگان در برابر تعویض و تقلبات غیر قانونی و تخلفات خاموش احتمالی حمایت گردند. برای نخستین بار چیکونی[۲] (۱۹۹۴) از روش PCR جهت شناسایی تقلب در گوشت و فرآورده های گوشتی جانوران اهلی استفاده نمود. در این میان DNA میتوکندری به سبب برتریهایی که دارد، برای مطالعات تشخیص گونه و تشخیص تقلب در محصولات فرآوری شدهٔ صنعتی و خوراک دام و طیور نسبت به DNA ژنومی ارجح است (۱).

---

[1] . Genetically modified organism

[2] . Chikuni

مواد و روش ها

پس از هموژن نمودن نمونه ها با ازت مایع، خارج نمودن روغن و چربی از سوسیس، کالباس، گوشت چرخ کرده و پودر ماهی با استفاده از متانول- کلروفورم و آب با نسبت (۰/۸ : ۱: ۲) انجام شد. استخراج DNA از نمونه ها به روش گوانیدین تیوسیانات – سلیکاژل صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش نورسنجی[3] تعین شد. جفت آغازگر اختصاصی اسب سانان با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 طراحی شدند. واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی اسب سانان (Equine 1: 5´-TTC TCA TCC GTC ACT CAC ATC TG-3´ و Equine 2: 5´-TAG GAA TGT GTA AGA GCC GTA GTA GAG-3) برای تکثیر قطعه ۱۴۴ جفت بازی جهت بررسی آلودگی احتمالی نمونه های ذکر شده به گونه های فوق توسط دستگاه ترموسایکلر (T personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود:(100 mM Tris-HCl (pH 8.8 ، ۱ U آنزیم *Taq* پلیمراز، ۰/۲ mM از هر dNTP، ۱/۵ mM از $MgCl_2$، ۵ پیکامول از مخلوط جفت آغازگراختصاصی و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی زیر و در ۳۵ سیکل تکثیر شد: ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ۶۰ دقیقه و با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شده و ژل مربوطه پس از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید برای بررسی محصولات توسط اشعه ماورای بنفش بررسی شد. برای آزمون اختصاصیت جفت آغازگر طراحی شده، واکنش PCR با استفاده از DNA گاو، گوسفند، بز، خوک و ماهی توسط دستگاه ترموسایکلر بر اساس روش استاندارد انجام شد.

نتایج

نتایج نورسنجی نشان داد که DNA های استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار هستند. الگوی باندی مربوط به کنترل مثبت (اسب و الاغ) استفاده شده در این آزمایش موید اختصاصی بودن آغازگر صرفاً با گونه اسب سانان و عدم تداخل آنها با سایر DNA ها بود (شکل-۱). همچنین این امر دلالت بر آن دارد که آغازگر طراحی شده تنها دارای یک قطعه هدف بر روی DNA می باشد و شباهت توالی در جاهای دیگر وجود ندارد. زیرا باند غیر اختصاصی، دایمر و یا اسمیر مشاهده نشده و باند ها همگی شفاف هستند. از طرفی عدم مشاهده باند درکنترل منفی نشان دهنده دقت و صحت نتایج آزمایش است. ضمناً الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR با آغازگر اختصاصی اسب سانان در نمونه های مورد آزمایش هیچگونه باندی مشاهده نشد (شکل-۲).

نتیجه گیری

به دلیل عدم مشاهده باند در ژل آگارز محصولات PCR، می توان نتیجه گرفت که در هیچ یک از نمونه های سوسیس، کالباس، گوشت چرخ کرده و پودر ماهی مورد استفاده در این آزمایش، قطعه ای تولید نگردیده است و لذا نتیجه گیری می شود که هیچ یک از نمونه های جمع آوری شده، به بافت اسب سانان آلوده نبودند و تمامی نمونه های جمع آوری شده از این نظر پاک می باشند.

[3] . Spectrophotometric method

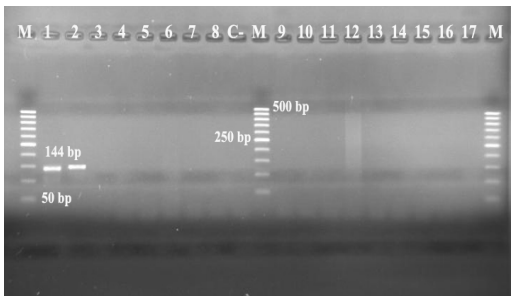
تشکر و قدردانی

از قطب علمی علوم دامی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد، و همچنین آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) به سبب فراهم نمودن بی شائبه امکانات و تسهیلات تحقیق و حمایت های مالی صمیمانه تشکر می شود.

منابع

1. Bravia, C. M., J. P. Lirona, P. M Mirolb, M. V. Ripolia, P. PeralGarcıaa, and G. Giovambattista. 2004. A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. Int J Legal Med. 6: 246–251.
2. Francisco, J., E. Santaclara, E. Montserrat, G. Cabado, and J. Vieites. 2007 Detection of Land Animal Remains in Fish Meals by the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Technique. Agric. Food Chem. 55: 305-310.
3. Ghovvati, S., F. E. Shahroudi, S. Z. Mirhosseini, M. R. Nassiri, A. H. Moussavi, A. Javadmanesh, and R. Pourseify. 2007. Fraud identification in fishmeal by 12s rRNA and 16s rRNA of mtDNA sequence. 5 st National biotechnology conference, p 482.
4. Ghovvati, S., M. R. Nassiri, S. Z. Mirhoseini, A. H. Moussavi, and A. Javadmanesh. (2008). Fraud identification in Iranian industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control. (Online)
5. Woolfe, M., and Primrose, S. 2004 Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends in Biotech. 22(5): 222-226.

شکل-۱- الکتروفورز محصولات PCR برای آزمون اختصاصی بودن آغازگر اسب سانان. شماره ۱ (DNA اسب)، شماره ۲ (DNA الاغ)، شماره ۳ (DNA گاو)، شماره ۴ (DNA گوسفند)، شماره ۵ (DNA بز)، شماره ۶ (DNA مرغ)، شماره ۷ (DNA خوک)، شماره ۸ (DNA ماهی کیلکا)، C- ←کنترل منفی، M نشانگر وزنی مورد استفاده (M50) برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی به ترتیب از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد: (۵۰۰-۴۵۰-۴۰۰-۳۵۰-۳۰۰-۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰).



شکل-۲- الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از آغازگر Equine. C- ←کنترل منفی، شماره ۱ (DNA شاهد اسب)، شماره ۲ (DNA شاهد الاغ)، شماره ۳- ۶ (نمونه های گوشت چرخ کرده)، شماره ۷ – ۱۰ (نمونه های سوسیس)،شماره ۱۰- ۱۳ (نمونه های کالباس)، شماره ۱۴- ۱۷ (نمونه های پودر ماهی)، M ←M50: نشانگر وزنی.