



تشخیص تقلب در پودر ماهی با استفاده از توالی‌های ژنی 12s rRNA و

16s rRNA از DNA میتوکندری

قوتی رودسری شاهرخ***¹، افتخاری شاهرودی فریدون¹، میرحسینی سید ضیاء الدین^{2,3}، نصیری محمد رضا¹، هروی موسوی¹ علیرضا، جواد منش علی¹ و پورسیفی رضا²

1- قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فرودوسی مشهد، صندوق پستی 91775-1163 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 پودر ماهی به لحاظ اقتصادی و بهداشتی بسیار حائز اهمیت می باشد. هدف از این تحقیق تشخیص وجود تقلب و شناسایی گونه‌های استفاده شده (نشخوارکنندگان، طیور و خوک سانان) در پودر ماهی با استفاده از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز بود. بدین منظور از پودر ماهی تولید کارخانه های مختلف تعداد 20 نمونه جمع آوری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش گوانیدین تیوسیانات- سیلیکاژل صورت گرفت. قطعات 104، 183 و 290 جفت بازی به ترتیب برای نشخوارکنندگان (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 پلیمرز به صورت Multiplex و آغازگر های اختصاصی نشخوارکنندگان، طیور و خوک سانان تکثیر شد. نتایج نشان دادند که نمونه‌های پودر ماهی جمع آوری شده هیچگونه آلودگی به بقایای بافتی خوک سانان نداشتند. اما 75 درصد نمونه‌های جمع آوری شده آلودگی به بقایای بافتی نشخوارکنندگان و 55 درصد آلودگی به بقایای بافتی طیور را نشان دادند. همچنین میزان آلودگی مشترک بقایای بافتی نشخوارکنندگان و طیور در پودر ماهی 45 درصد برآورد شد.

کلمات کلیدی: تشخیص تقلب، DNA میتوکندری، پودر ماهی، 12s rRNA، 16s rRNA و Multiplex PCR

مقدمه

تولید کنندگان و پرورش دهندگان نیاز به اطلاعات شفاف و دقیق جهت خرید مواد خوراکی برای تغذیه دام و طیور خود دارند. تشخیص گونه‌ها در محصولات غذایی با استفاده از ژنهای مخصوص بکارگیری روش PCR در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفت. بیماری‌هایی چون جنون گاوی و آنفولانزای مرغی، سوء استفاده بعضی تولیدکنندگان مواد غذایی، دلایل مذهبی، حساسیت‌ها (آلرژی‌های) غذایی و غذاهای ترانس ژنتیک (GMOs)¹ باعث افزایش نگرانی مردم در خصوص ترکیبات محصولات غذایی شده است (8 و 5). گاهی اوقات برچسب محصولات غذایی تضمین کافی و درستی را از ترکیب واقعی خوراکیها نمی‌دهند، لذا لازم است روش‌هایی برای تعیین و تصدیق ترکیبات خوراک وجود داشته باشد تا همه از مصرف کنندگان و هم تولید کنندگان در برابر تعویض و تقلبات غیر قانونی حمایت گردد. تشخیص اختصاصی گونه‌ها و شناسایی گروه‌های حیوانی از قبیل نشخوارکنندگان (جهت حفظ سلامت عمومی و جلوگیری از گسترش بیماریهای TSE) بر اساس تقسیم بندی قوانین اتحادیه اروپا جهت آزمون سالم بودن تولیدات پروتئینی حیوانی در مواد غذایی و خوراک دام و طیور استفاده می شود (5). از جمله مزیت‌های روش PCR نسبت به سایر روش ها می توان دقت و سرعت زیاد، حساسیت بالا و انعطاف پذیری این روش نسبت به سایر روشها اشاره کرد (6). برای

¹ . Genetically modified organism

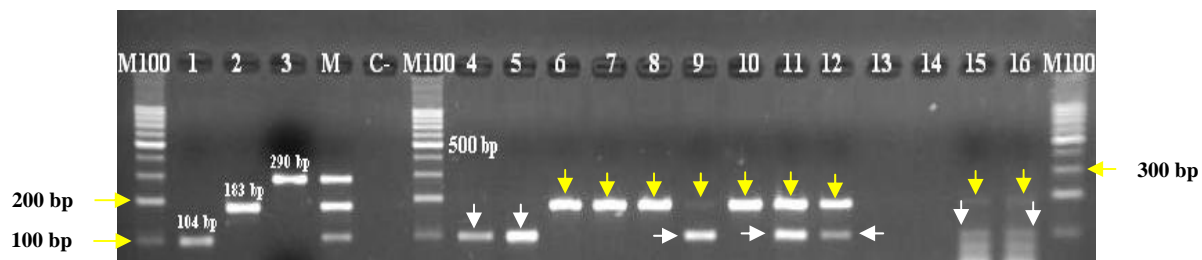


نتایج نوسنجی نشان داد که DNA های استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR

برخوردار هستند. الگوی بانندی مربوط به کنترل مثبت استفاده شده در این آزمایش تأیید کننده اختصاصی بودن باندهای حاصل از آغازگرهای اختصاصی نشخوارکنندگان، طیور و خوک سانان است. از طرفی عدم مشاهده باند در کنترل 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 بانندی مشاهده نشد می توان نتیجه گرفت که در هیچ یک از نمونه های مورد استفاده در این آزمایش، قطعه ای تولید نگردیده است می توان نتیجه گرفت که هیچ یک از نمونه های مورد آزمایش، به بافت خوک سانان آلوده نبودند. اما در مجموع در 15 نمونه پودر ماهی آلودگی به بقایای بافتی نشخوارکنندگان و 11 نمونه پودر ماهی آلودگی به بقایای بافتی طیور مشاهده گردید که در شکل-1 مشخص گردیده است. همچنین تعداد 9 نمونه از پودرهای ماهی جمع آوری شده آلودگی مشترک به بقایای بافتی نشخوارکنندگان و طیور را نشان دادند. 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 خوراک پروتئینی دام و طیور است. که برای این منظور روش Multiplex که در این تحقیق استفاده و بهینه شد می تواند جهت کنترل سایر 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 پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) صمیمانه تشکر می شود.



شکل-1- الکتروفورز محصولات Multiplex PCR. شماره 1 (DNA گاو)، شماره 2 (DNA مرغ)، شماره 3 (DNA خوک)، M ← Multiplex PCR، C- ← کنترل منفی، شماره 4 - 16 (نمونه های پودر ماهی)، 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 (100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000).

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. 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.
4. Dalmaso, 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.
5. 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.
6. 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.
7. Tartaglia, M., E. Saule, S. Pestalozza, L. Morelli, G. Antonucci, and P. A. Battaglia. (1998) Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feed: a molecular approach to test for the presence of bovine derive materials. *Food Protection.* 61:513-518.
8. Woolfe, M., and Primrose, S. (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *TRENDS in Biotechnology.* 22(5): 222-226.

Fraud identification in fishmeal by 12s rRNA and 16s rRNA of mtDNA sequence

Ghovvati***¹, S., F. E. Shahroudi¹, S. Z. Mirhoseini², M. R. Nassiri¹, A. H. Moussavi¹, A. Javadmanesh¹,
& R. Pourseify²

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 feedstuff is very important in respect to economic and sanitarly. The object of this study was the identification of cheating and the animal species (Ruminant, Poultry and Pork) used in feedstuffs using multiplex PCR. Samples were collected from fish meal (20 samples) from different companies. DNA extraction was done based on the guanidinium thiocyanate-silicagel method. In 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 were contaminated with porcine residuals but 75% of fish meal samples were contaminated with ruminant residuals and 55% of fish meal samples were contaminated with poultry residuals. In fish meal, 45% of samples were contaminated with both of ruminant and poultry residuals.

Key words: Cheating identification, Mitochondrial DNA, Fish meal, 12s rRNA, 16s rRNA, and Multiplex PCR.