Archive of SID

مجله پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۱۹ شماره ۱/ سال ۱۳۸۸

استفاده از ژن سیتوکروم b میتوکندری برای تشخیص همزمان گوشت گاو، گاومیش، گوسفند و بز به روش Multiplex-PCR

نصراله پیرانی[1*] و قربان الیاسی زرین‌قبایی[2]

تاریخ پذیرش: 88/2/13

1- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی

*مسئول مکاتبه E-mail: npirany@gmail.com

چکیده

گوشت گاو یکی از پر مصرف‌ترین گوشت‌های مورد استفاده در دنیا بوده و مصارف فراوانی دارد. و گاهی اوقات نیز با گوشت گاومیش، بز و گوسفند مخلوط می‌گردد. برای تشخیص نوع گوشت در فرآورده‌های پروتئینی روش‌های مختلفی بکار گرفته می‌شود که یکی از آنها استفاده از برخی از اجزای DNA میتوکندری بعنوان DNA الگو است. در این تحقیق نمونه‌های گوشت از گونه‌های فوق‌الذکر جمع‌آوری شده و آسیاب گردید. استخراج DNA از ۲۵۰ میلیگرم گوشت هر نمونه انجام شد و کمیت و کیفیت آن به روش‌های مشاهده بر روی ژل و تست با اسپکتروفتومتر بررسی گردید. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، آغازگرهایی طراحی شد که برای هر گونه قطعه متفاوتی از ژن سیتوکروم b تکثیر گردد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت جداگانه و همچنین به طور همزمان با مخلوطی از آغازگرها انجام شد. نواحی تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲% الکتروفورز شده سپس توسط اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و نوارهای الگو بدست آمد. در این تحقیق نوارهای ۱۲۴، ۳۳۰، ۴۷۲ و ۵۸۵ جفت بازی به ترتیب نشانگر گونه‌های گاومیش، بز، گاو و گوسفند بود. تکثیر ناحیه مورد نظر از هر گونه بیانگر وجود گوشت آن گونه در مخلوط گوشت و یا فرآورده‌های پروتئینی بود.

واژه‌های کلیدی: تشخیص گوشت، ژن سیتوکروم b، میتوکندری، Multiplex PCR

Use of Mitochondrial Cytochrome Gene b for Simultaneous Detection of Cattle, Buffalo, Sheep and Goat Meat by Multiplex-PCR

N Pirany[1*] and Gh Elyasi Zarringhabaie[2]

[1]Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]East Azerbaijan Research Center for Agriculture and Natural Resources
*Corresponding author: E-mail: npirany@gmail.com

Abstract

Cattle Meat is prevalent type of produced meat in the world and has many usages. Therefore, it is adulterated with buffalo, goat, and sheep meat. There are different methods for detection of meat source in protein products. One of them is using some sections of Mitochondrion DNA as template DNA. In this research meat samples of above species were obtained and then grind. After extracting

www.SID.ir

Archive of SID

genomic DNA from 250 mg of grind meat samples, their quality and quantity were determined by gel monitoring and spectrophotometery. For polymerase chain reaction, different primers were designed from mitochondrion sequences which produced different lengths of Cytochrome b gene in each species. Polymerase chain reaction was done separately or on a mixture of primers. Products of amplifications were recognized by electrophoresis on 2% agarose gel after staining with ethidium eromide. In this research, products with sizes of 124, 330, 472 and 585 bps were specific for buffalo, goat, cattle and sheep species, respectively. In conclusion presence of each band in a mixture of meats was an indicator of meat source in the protein product.

Keywords: Cytochrome b gene, Meat source detection, Mitochondria, Multiplex PCR

مقدمه

از زمان‌های قدیم گوشت دام‌های اهلی بعنوان منبع پروتئین، انرژی، مواد معدنی و ویتامینی مورد توجه بشر و جزء لاینفک سفره غذایی بوده است. این مواد پروتئینی با توجه به شباهت زیاد ساختمانی و بیولوژیک با بدن انسان قابلیت استفاده بهتری نسبت به منابع پروتئینی گیاهی دارند. با وقوع تحولات صنعتی و پیشرفت تکنولوژی، روش‌های فرآوری گوشت و تولید محصولات پروتئینی نیز دچار تغییرات شگرفی شده و کارخانجات نوین تولید کننده مواد غذایی قادرند روزانه میلیون‌ها تن گوشت را فرآوری و به چرخه مصرف وارد کنند. افزایش اطلاعات مربوط به ارزش غذایی و گرایش مصرف کنندگان به مصرف غذاهای مناسب برای تامین رشد و کارآیی بدن سبب شده است که سرانه مصرف فرآورده‌های گوشتی در کشورهای توسعه یافته در طی دهه‌های گذشته افزایش یابد که متضمن رشد جسمانی و تامین کننده انرژی سرشار برای کار و فعالیت انسان می‌باشد.

یکی از مشکلات اصلی صنایع غذایی امروزی اختلاط در محصولات چرخ شده و فرآورده‌های گوشتی است بنابراین تعیین گونه دام‌های تولید کننده گوشت و فرآورده‌های گوشتی به دلایل سلامتی (وجود آلرژی در برخی افراد)، بهداشت (بیماری جنون گاوی)، عقاید مذهبی و ارزش اقتصادی از اهمیت خاصی برخوردار است (میگوال و همکاران ۲۰۰۴). آزمون منشأ گونه‌ای گوشت نه فقط برای خوراک انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد بلکه در کارخانجاتی که جهت تهیه مواد خوراکی دام و طیور از منابع پروتئین دامی استفاده می‌کنند نیز حائز اهمیت است. بعنوان مثال، آلوده شدن خوراک دام و طیور به گوشتهای گاوی که دارای بیماری جنون گاوی باشند می‌تواند خسارت‌های جبران‌ناپذیری را به جوامع انسانی تحمیل کند.

در اتحادیه اروپا قانونی بنام تایید اصالت[1] بنا گذاشته شده تا بتوانند منشأ فرآورده‌های دامی را در موقع نیاز جستجو و شناسایی نمایند. از طرفی در دنیای کنونی، که تمام محصولات عرضه شده به بازار دارای برچسب و شناسنامه می‌باشند برای وارد شدن به این داد و ستد باید محصولاتی سالم و دارای شرایط استاندارد ارائه شوند. در همین راستا اختلاط محصولات گران قیمت با فرآورده‌های ارزان و نامناسب دست اندرکاران و محققین را بر آن داشت تا روشی مناسب برای تشخیص منشأ محصول از جمله گوشت ارائه کنند (رائو و همکاران ۱۹۹۵).

[1]Proof of Origin

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های استفاده شده برای تعیین گونه از روی گوشت خام شامل آنالیز چشایی، اختلافات آناتومیکی، تفاوتهای بافتی، موی پیدا شده بر روی گوشت، خصوصیات چربی بافت، سطح گلیکوژن بافت، نوع بافت عضلانی و یا روش‌های جدید دورگ‌گیری DNA و الکتروفورز می‌باشند (هانت و همکاران ۱۹۹۷، پارتیس و همکاران ۲۰۰۰). بسیاری از این روشها در عمل به دلیل تخصصی بودن، پیچیدگی و هزینه زیاد و نیاز به تجهیزات گران قیمت کاربرد محدودی دارند. برخی از روش‌های دیگر (مانند نقطه ایزوالکتریک) نیز نیازمند داشتن اطلاعات پایه در مورد خصوصیات فیزیکی-شیمیایی پروتئین‌ها هستند.

همانطوری که ذکر شد روش‌های معمول مورد استفاده برای تعیین منشا گونه‌ای گوشت و محصولات گوشتی عمدتاً بر پایه روش‌های ایمونوشیمیایی و الکتروفورز پروتئین‌ها استوار هستند. با توجه به این که پروتئین خود نتیجه ترجمه توالیهای DNA می‌باشد لذا استفاده از توالیهای DNA می‌تواند نتایج بهتر و دقیقتری بدست دهد. لذا، با پیشرفت تکنولوژی و بخصوص در عرصه زیست شناسی مولکولی، تعیین هویت گیاهان، باکتریها و گونه‌های جانوری با دقت بیشتری امکان‌پذیر شد. در این خصوص استفاده از ویژگیهای DNA میتوکندری (مالیزا و همکاران ۲۰۰۶) و ژنهای مستقر بر روی آن (ایروین و همکاران ۱۹۹۱) در کنار واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (سایکی و همکاران ۱۹۸۸، گولی و همکاران ۱۹۹۹، ماتسوناگا و همکاران ۱۹۹۹) به همراه نشانگرهای مولکولی نظیر چندشکلی طول قطعات برش یافته[1] (ورکار و همکاران ۲۰۰۲)، قطعات DNA چندشکل تصادفی (ارسلان و همکاران ۲۰۰۵) و تکنیک دقیق Real Time-PCR (برودمن و مور ۲۰۰۳، ساویر و همکاران ۲۰۰۳) به طور مکرر برای تعیین منشأ گونه‌ای گوشت بکار گرفته شدند. وینترو و همکاران (۱۹۹۰) روش‌های ایمونوپخش[2]، ایمونوالکتروفورز، نقطه ایزوالکتریک و دورگ‌گیری DNA را برای تشخیص منشأ گونه‌ای گوشت با همدیگر مقایسه نموده و گزارش کردند که دورگ‌گیری DNA نسبت به سایر روش‌ها، قابل اعتمادتر و دقیق‌تر است، ولی دارای هزینه بالایی بوده و به زمان بیشتری نیازمند است که زمان‌بر بوده و هزینه بالای این روش توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (مایر و همکارن ۱۹۹۶، کُه و همکاران ۱۹۹۸، چیکونی و همکاران ۱۹۹۰، ابهوج و تامسون ۱۹۹۱). ولی هاپوود و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از PCR وجود ۱% گوشت طیور را در محصولات گوسفندی مشخص کرده و مایر و همکاران (۱۹۹۴) نیز توانستند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای دوگانه[3] وجود ۰/۵% گوشت خوک را در فرآورده‌های گاو تشخیص دهند که بیانگر ارجحیت روش PCR بر دیگر روش‌های مورد استفاده است. اوبروسکا و همکاران (۲۰۰۲) نوارهای اختصاصی ۲۲۷، ۲۷۴، ۳۹۸، ۴۹۸ جفت بازی را به ترتیب برای تفکیک گوشت طیور، گاو، خوک و اسب با موفقیت تکثیر نمودند و جین و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از آغازگرهای آنها و افزودن چند گونه دیگر به آزمایش گزارش نمودند که استفاده از PCR چندگانه روش مناسبی برای تفکیک گوشت طیور، بز، گاو، گوسفند، خوک و اسب است ولی این محققین به دلیل استفاده مشترک از آغازگرهای گاو و گاومیش نتوانستند گوشت گاو را از گاومیش تمیز دهند. وانگ و همکاران (۲۰۰۷) بار دیگر بر ارزش ژن‌های مستقر بر روی DNA میتوکندری به منظور تشخیص گونه تاکید نموده و با استفاده از PCR-RFLP گونه‌های خوک، گاو و طیور را از همدیگر تمیز دادند.

اگرچه تکنیک PCR می‌تواند دقت آزمایش‌های تعیین گونه را افزایش دهد (چیکونی و همکاران ۱۹۹۴، لاهیف و همکاران ۲۰۰۱)، ولی استفاده از روش واکنش

[1] Restriction Fragment Length Polymorphism

[2] Immuno Diffusion

[3] Duplex PCR

www.SID.ir

Archive of SID

زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه[1] که می‌تواند چند واکنش را تنها در یک تیوپ انجام داده و نواحی هدف متعددی را در زمان کوتاهی بطور همزمان ردیابی کند و داشتن حساسیت بالا، تکرارپذیری زیاد، سرعت، سادگی و ارزان بودن روش قابل اعتمادتری برای استفاده در سازمان استاندارد و شرکتهای بازرسی محصولات گوشتی می‌باشد (سائز و همکاران ۲۰۰۴). لذا، این تحقیق به منظور استفاده عملی از این تکنیک برای تشخیص گوشت گونه‌های گاو، گاومیش، بز و گوسفند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌ای (ژن سیتوکروم b میتوکندری) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، اطلاعات کل ژنوم میتوکندری گونه‌های مورد نظر از سایت بانک جهانی ژن گرفته شد و با نرم‌افزارهای ژنتیک مرتب‌سازی[2] گردید. سپس ناحیه مشترکی برای هر چهار گونه روی سیتوکروم b پیدا شد و یک آغازگر مشترک برای آن طراحی گردید و به تبع آن آغازگرهای اختصاصی هر گونه با بیشترین اختلاف نسبت به سایر گونه‌ها نیز طراحی و سنتز شدند (جدول ۱). با این روش تنها با یک واکنش تکثیر و الکتروفورز محصولات آن بر روی ژل آگارز نوع گوشت را می‌توان تشخیص داد. در ابتدا نمونه های گوشت خالص از هر کدام از گونه های مورد مطالعه (گاو، گاومیش، گوسفند و بز) تهیه و DNA ژنومی (حاوی DNA میتوکندریایی) به طور جداگانه از هر نمونه و مخلوط (به نسبت های مساوی و مختلف) آنها استخراج گردید.

استخراج DNA با استفاده از سیلیکاژل با روش بوم و همکاران (۱۹۸۹) که توسط شیخایف (۱۹۹۵) تغییراتی در آن داده شده بود از ۲۵۰ میلی‌گرم گوشت (پس از آسیاب کردن با ازت مایع) انجام گرفت. در این روش ابتدا سلول‌های گوشت با مواد شیمیایی لیز شده و سپس ذرات بسیار ریز شیشه که DNA را به خود جذب می‌کند به محلول اضافه شد و پس انجام چند مرحله رسوب‌گیری، در مرحله آخر DNA خالص‌سازی گردید. جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA از روش‌های الکتروفورز و اسپکتروفتومتری استفاده شد. برای تکثیر نواحی هدف توالی میتوکندری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۳۷ چرخه و تحت رژیم حرارتی زیر انجام گردید: برای واسرشته کردن $94^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه، برای اتصال آغازگرها $58^{\circ}C$ به مدت ۶۰ ثانیه و برای بسط زنجیره $72^{\circ}C$ به مدت ۹۰ ثانیه. بدین منظور دستگاه ترموسایکلر شرکت Biometra مورد استفاده قرار گرفت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم‌های ۵۰ میکرولیتری (بافر یک برابر PCR، ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۲/ ۰میلی‌مولار از هر dNTP، ۲۰ میکرومول از آغازگر مشترک، ۱۰ میکرومول از هر آغازگر اختصاصی و ۲ واحد Taq DNA Polymerase بهمراه ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده) صورت گرفت. جهت تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۲% با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

نتایج و بحث

DNA استخراج شده از بافت گوشت به روش سلیکاژل در برخی موارد بدون کشیدگی و در برخی نمونه‌ها نیز نوارهای کشیده ای بر روی ژل آگارز ایجاد کردند که نشان دهنده شکسته شدن مولکولهای DNA بود ولی اثرات آلودگی با نمکها و نیز اثرات وجود RNA در محلول استخراج شده مشاهده نشد که بر خلوص DNA استخراج شده دلالت می‌کرد. روش اسپکتروفتومتری در تعیین خلوص DNA استخراج شده نتایج حاصل از ژل آگارز را در استخراج DNA تایید کرد. بطوریکه، نسبت جذب نوری 260/280 نانومتر در نمونه‌های DNA

[1] Multiplex-PCR
[2] Alignment

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- آغازگرهای مشترک و اختصاصی طراحی شده برای تشخیص نوع گونه دامی

نام آغازگر	توالی آغازگر (´3-´5)	تعداد جفت باز تکثیر شده
Common Reveres Primer	TGTCCTCCAATTCATGTGAGTGT	-
Buffalo Forward Primer	TCCTCATTCTCATGCCCCTG	124 bp
Goat Forward Primer	CGCCATGCTACTAATTCTTGTT	330 bp
Cattle Forward Primer	TCCTTCCATTTATCATCATAGCAA	472 bp
Sheep forward Primer	TACCAACCTCCTTTCAGCAATT	585 bp

استخراج شده، در محدوده ۱/۵ الی ۱/۹ قرار داشتند و در نتیجه خلوص DNA در حد بالایی بوده و دارای مقادیر بسیار کمی از RNA و یا پروتئین بود.

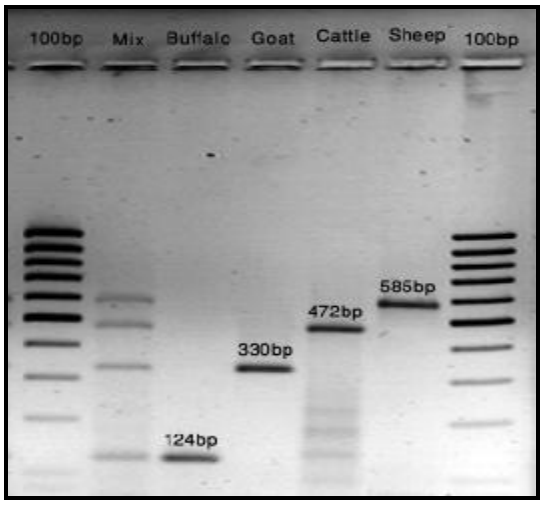
شکل ۱ نتایج الکتروفورز نهایی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل ۲% آگارز با نمونه‌های خالص و مخلوط گوشت را نشان می‌دهد. مقایسه نوارهای حاصله با توالی هدفی که در طراحی آغازگرها در نظر گرفته شده بود (جدول ۱) نشان دهنده این است که تکثیر قطعات اختصاصی ژن سیتوکروم b میتوکندری هر گونه و الکتروفورز نمونه‌ها به درستی انجام شده و نتایج قابل استناد می باشند. در شکل ۱ نمونه مخلوط به مفهوم اختلاط گوشت این گونه‌ها به نسبت مساوی می‌باشد. در شکل ۲ نتایج حاصل از اختلاط نسبتهای مختلف گوشت گونه‌های مورد آزمایش ارائه شده و درخشندگی هر یک از نوارهای الکتروفورز نشان دهنده مقدار و سهم تقریبی هر کدام از گونه‌ها در ترکیب است بنابراین با این روش علاوه بر اینکه می‌توان وجود ترکیب اضافه شده را به بافت اصلی گوشت بصورت دقیق مشخص نمود علاوه بر آن می توان از روی درخشندگی نوارهای تولید شده نسبت تقریبی گوشت مخلوط شده را نیز حدس زد.

نکته‌ای که باید متذکر شد روشنایی هر یک از نوارهای ارائه شده در الگوهای الکتروفورز ژل آگارز است که از عوامل مختلفی همانند نوع نمونه و طول ناحیه تکثیر شونده متاثر می‌گردد بنابراین فراهم آوردن شرایط مطلوب چه از لحاظ دمایی و چه ترکیب مواد برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مهم است. در چنین مواردی که وجود یا عدم وجود (صرف نظر از مقدار) یک نوار الکتروفورز برای تایید و یا رد محصولی اهمیت زیادی دارد باید نهایت دقت در کالیبره نمودن دستگاه صورت گیرد و از نمونه‌های استاندارد استفاده شود تا اشتباه در آزمایشات به حداقل برسد. بنابراین، جهت تعیین نوع گونه تولید کننده گوشت نیاز به ارائه روشی دقیق، سریع و ساده و بدون محدودیتهای فوق می‌باشد. با گذشت زمان روش‌های جدیدی معرفی شده اند که هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند.

نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد چرخه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دارای نقش کلیدی در تعیین اختلاط گوشت در درصدهای پایین است که این موضوع در نتیجه‌گیری ارفان الهاق و ارسلان (۲۰۰۷) نیز با مقایسه ۳۰ چرخه و ۳۵ چرخه به صراحت گزارش شده است. در این تحقیق نوار ۳۳۰ جفت بازی نشان دهنده وجود ترکیباتی با منشأ بز است ولی به دلیل اینکه در منطقه آذربایجان استفاده از بز و تولید محصولات آن چندان رایج نیست لذا، فرآورده‌ای که منشا گونه بز را نشان دهد چندان به چشم نمی‌خورد، در صورتی که در استانهای جنوبی و گرمسیر کشور که گوشت بز متناسب با ذایقه مردمان آن دیار است تشخیص تقلب در فرآورده‌های بز اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. وجود نوار ۵۸۵ جفت بازی بیانگر وجود سلولهای بافت گوشت گونه گوسفند است. با در نظر گرفتن اینکه گوشت حاصل از گوشت گوسفند (بر خلاف شیر آن) از نظر غذایی و ذایقه مصرف ارزش کمتری نسبت به گاو دارد سودجویان برای حصول سود بیشتر احتمالاً گوشت گاو را با

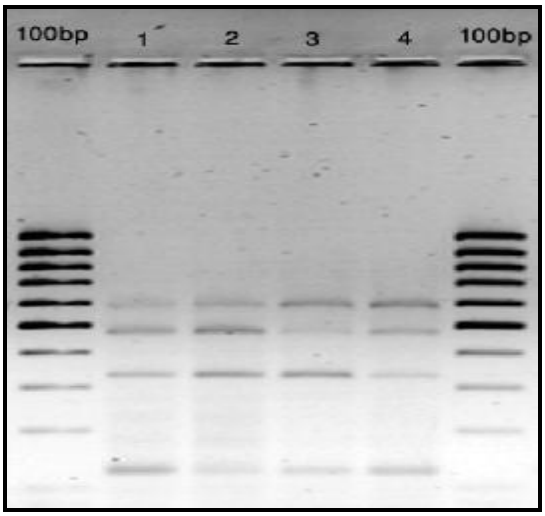
www.SID.ir

Archive of SID



شکل 1- نوار حاصل از تکثیر اختصاصی هر گونه و مخلوطی مساوی از گوشت هر 4 گونه در کنار نشانگر اندازه (100bp)

درصدهایی از گوشت گوسفند مخلوط می‌کنند و با نام گوشت گاو وارد بازار مصرف نموده که در واقع عمده‌ترین مورد تقلب در گوشت و فرآورده‌های پروتئینی را در بین این چهار گونه به خود اختصاص داده است. در مورد گاومیش نیز شرایط همانند گوسفند بوده و شیر آن نسبت به گوشت ترجیح داده می‌شود، بنابراین در تهیه محصولات گاومیش معمولا در مورد فرآورده‌های لبنی آن تقلب صورت گرفته ولی در مورد فرآورده‌های پروتئینی گوشت گاومیش به فرآورده‌های گاو افزوده می‌شود (وجود نوار 124 جفت بازی بیانگر آن است).



شکل 2- تعیین گوشت گونه در نمونه‌های مخلوط شده گوشت با درصدهای مختلف در کنار نشانگر استاندارد (100bp)
(نمونه 1: گوسفند 10، بز 20، گاو 30 و گاومیش 40 درصد - نمونه 2: گوسفند 20، بز 30، گاو 40 و گاومیش 10 درصد
نمونه 3: گوسفند 30، بز 40، گاو 10 و گاومیش 20 درصد - نمونه 4: گوسفند 40، بز 10، گاو 20 و گاومیش 30 درصد)

با توجه به این که در حال حاضر آن مواد پروتئینی که از منابعی غیر از گوشت گاو و گوسفند تولید می‌گردند بیشتر بصورت سنتی تهیه و عرضه می‌شوند و از ارزش نسبتاً پایینی برای تشخیص تقلب

www.SID.ir

Archive of SID

برخوردار هستند چندان مورد توجه سازمان استاندارد و بازرسین رسیدگی به صنایع غذایی نمی‌باشند اجرای چنین آزمایشاتی شاید در حال حاضر در کشور با استقبال کمتری مواجه شوند، ولی با پیشرفت تکنولوژی و گذشت زمان که کل صنایع اختصاصی‌تر می‌گردد انتظار بر این است که فرآورده‌های پروتئینی و لبنی هر گونه بصورت مجزا و اختصاصی تولید شود که قاعدتا دارای ارزش اقتصادی متفاوتی خواهند بود لذا آزمایشاتی مشابه این تحقیق بخوبی خواهند توانست نیازهای سازمانهای مسئول را در زمینه بازرسی و ارزیابی محصولات گوشتی با روشی سریع و قابل اعتماد مرتفع سازند. نتایج بدست آمده در این تحقیق، توانایی این روش را بعنوان روشی مرجع و کارآمد برای تشخیص تقلب در فرآورده‌های لبنی و پروتئینی نشان داده بعلاوه چون در این تکنیک (Multiplex-PCR) که چندین واکنش پلیمرازی فقط در یک تیوپ انجام می‌شود روش سریع، دقیق، کم هزینه و کارآمدی خواهد بود.

منابع مورد استفاده

Arslan A, Ilhak I, Calicioglu M and Karahan M, 2005. Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Journal Muscle Foods 16: 37 - 45.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim - Van Dillen PM and Van Der Noordaa J, 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology 28: 495 - 503.

Brodmann PD and Moor D, 2003. Sensitive and semi - quantitative TaqMan™ real time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. Meat Science 65: 599 - 607.

Chikuni K, Ozutsumi K, Koishikawa T and Kato S, 1990. Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. Meat Science 27:119 - 128.

Chikuni K, Tabata T, Kosugiyama M and Monma, M, 1994. Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. Meat Science 37: 337 - 345.

Ebbehoj KF and Thomsen PD, 1991. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. Meat Science 30: 221 - 234.

Guoli Z, Mingguang Z, Zhijiang Z, Hongsheng O and Qiang L, 1999. Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. Meat Science 51: 233 - 236.

Hopwood AJ, Fairbrother KS, Lockley AK and Bardsley RG, 1999. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. Meat Science 53: 227 - 231.

Hunt DJ, Parkes HC and Lumley ID, 1997. Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. Food Chemistry 60:437 - 442.

Irfan Ilhak O and Arsalan A, 2007. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science 31: 159 - 163.

www.SID.ir

Archive of SID

Irwin DM, Kocher TD and Wilson AC, 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. Journal of Molecular Evolution 32: 128 - 144.

Jain S, Brahmbhait MN, Rank DN, Joshi CG and SolankJ V, 2007. Use of cytochrome b gene variability in detecting meat species by multiplex PCR assay. Indian Journal of Animal Science 77: 880 - 881.

Koh MC, Lim CH, Chua SB, Chew ST and Phang STW, 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. Meat Science 48:275 - 285.

Lahiff S, Glennon M, Brien L, Lyng J, Smith T, Maher M and Shilton N, 2001. Species - specific PCR for the identification of bovine, porcine, and chicken species in meat and bone meal (MBM). Molecular Cell Probes 15: 27 - 35.

Malisa AL, Gwakisa P, Balthazary S, Wasser SK and Mutayoba BM, 2006. The potential of mitochondrial DNA markers and polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism for domestic and wild species identification. African Journal of Biotechnology 5: 1588 - 1593.

Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J and Shinmura Y, 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science 51: 143 - 48.

Meyer R, Candrian U and Luthy J, 1994. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. Journal of Stored Products Research 77: 617 - 622.

Meyer R, Chardonnens F, Hubner P, Luthy J, 1996. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of Soya in processed meat products. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung undForschung 203: 339 - 344.

Miguel AR, Teresa G, Isabel G, Luis A, Pablo EH and Rosario M, 2004. PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat treated meat mixtures. Journal of Food Protection 67: 172 - 77.

Obrovska I, Steinhauserova I. and Nebola M. 2002. The application of the PCR method to the identification of meat species. Folia Veterinaria 46: 113 - 18.

Ong SB, Zuraini MI, Jurin WG, Cheah YK, Tunung R, Chai LC, Haryani Y, Ghazali FM and Son, R, 2007. Meat molecular detection: Sensitivity of polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. ASEAN Food Journal, 14: 51 - 59.

Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, Murby J, 2000. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. Meat Science, 54: 369 - 376.

Rao KBCA, Kowale B, Nand Totey SM, 1995. Sex-specific identification of raw meat from cattle, buffalo, sheep and goat. Meat Science 39: 123 - 126.

Saez R, Sanz Y and Toldr F, 2004. PCR - based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. Meat Science 66: 659 - 665.

www.SID.ir

Archive of SID

Saiki RB, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Highuci R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA, 1988. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable QNA polymerase. Science 239: 487 - 91.

Sawyer J, Wood C, Shanahan D, Gout S, McDowell D, 2003. Real time PCR for quantitative meat species testing. Food Control 14: 579 - 583.

Shaikhayev GO, Myakishev MV, Kapanadze GI, Georgiev GP and Beritashvili DR, 1995. Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. Technical Report, Institute of Gene Biology, Moscow, Russia.

Verkaar ELC, Nijman IJ, Boutaga K, Lenstra JA, 2002. Differentiation of cattle species in beef by PCR - RFLP of mitochondrial and satellite DNA. Meat Science 60: 365 - 369.

Wintero AK, Thomsen PD and Davies W, 1990. A comparison of DNA hybridization, immuno diffusion, counter current immuno electrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. Meat Science 27: 75 - 91.

www.SID.ir