Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره۳ ، پاییز ۱۳۸۷
صفحه۴۸-۴۵

تشخیص تقلب در پودر ماهی با استفاده از توالی‌های ژنی 12S rRNA و 16S rRNA از DNA میتوکندری

شاهرخ قوّتی رودسری*[۱و۲]، محمد رضا نصیری[۱]، سید ضیاء الدین میرحسینی [۲و۳]، مجتبی طهمورث پور ،علیرضا هروی موسوی[۱]، علی جواد منش[۱]، مهدی سلطانی[۱]، حسن عباسی[۱] و محمد دوستی[۱]

۱- دانشجوی دکتری قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ghovvati@stu-mail.um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵)

چکیده

شناسایی گونه‌های حیوانی استفاده شده در تهیه 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 پلیمراز بود. بدین منظور از پودر ماهی تولید کارخانه های مختلف تعداد ۲۰ نمونه جمع آوری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش گوانیدین تیوسیانات- سیلیکاژل صورت گرفت. قطعات ۱۰۴، ۱۸۳ و ۲۹۰ 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 میتوکندریایی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز به صورت Multiplex و آغازگرهای اختصاصی نشخوار کنندگان، 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 ۷۵ درصد نمونه‌های جمع آوری شده آلودگی به بقایای بافتی نشخوارکنندگان و ۵۵ درصد آلودگی به بقایای بافتی طیور را نشان دادند. همچنین میزان آلودگی مشترک بقایای بافتی نشخوار کنندگان و طیور در پودر ماهی ۴۵ درصد برآورد شد .

واژه های کلیدی

تشخیص تقلب ،
DNA میتوکندری ،
پودر ماهی ،
12S rRNA ،
16S rRNA ،
Multiplex PCR ،

www.SID.ir

Archive of SID

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 و بکارگیری روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است(٦). بیماری‌هایی چون جنون گاوی و آنفولانزای مرغی، سوء استفاده بعضی تولیدکنندگان مواد غذایی و خوراکی، دلایل مذهبی، حساسیت‌های غذایی و غذاهای ترانس ژنیک (GMO)[1] باعث افزایش نگرانی مردم در خصوص ترکیبات محصولات غذایی و خوراکی شده است (٥ و ٩). 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 همهٔ مصرف کنندگان و تولید کنندگان در برابر تعویض و تقلبات غیر قانونی حمایت شوند. تشخیص اختصاصی گونه ها و شناسایی گروه‌های حیوانی از قبیل نشخوار کنندگان (جهت حفظ سلامت عمومی و جلوگیری از گسترش بیماریهای TSE[2]) بر اساس قوانین اتحادیه اروپا جهت آزمون سالم بودن تولیدات پروتئینی حیوانی در مواد غذایی و خوراک دام و طیور استفاده می شود (٥ و ٧). 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 (٦). برای نخستین بار چیکونی[3] (١٩٩٤) از روش PCR جهت شناسایی تقلب در گوشت و فرآورده های گوشتی جانوران اهلی استفاده نمود (٣). سپس در سال ١٩٩٨ یک آزمایش PCR با توان شناسایی بافت نشخوار کنندگان در گوشت و استخوان دام و طیور(MBM)[4] ابداع شد(٨). دالماسو و همکاران (٢٠٠٤) با طراحی آغازگرهای اختصاصی از نواحی متفاوت DNA میتوکندری (12S rRNA و 16S rRNA) جهت تشخیص تقلب در خوراک حیوانات چهار دسته از حیوانات (٣ گونه نشخوار کننده، ٢ گونه پرنده، خوک سانان و ١٢ گونه ماهی) را شناسایی نمودند که نتایج وجود تقلب در مواد خوراکی را اثبات کردند (٤). قوّتی و همکاران (٢٠٠٨) با تاکید بر نواحی ژنی متفاوت DNA میتوکندری (12S rRNA و 16S rRNA) و آزمودن نمونه های مواد غذایی (سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده) نسبت به شناسایی و ردیابی گونه ای حیوانی استفاده شده اقدام نمودند که نتایج نشان از اعمال تقلب در برخی از این فرآورده های غذایی صنعتی داشت (٦). هدف اصلی از این تحقیق توسعه و بهینه نمودن Multiplex PCR از نواحی ژنی 12S rRNA و 16S rRNA برای تشخیص اختصاصی نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان در پودر ماهی بود. به کمک این روش نیز می توان گونه های حیوانی استفاده شده در سایر مواد خوراکی را نیز از یکدیگر متمایز نمود.

مواد و روش‌ها

پس از همگن‌سازی نمونه ها با ازت مایع، روغن و چربی از پودر ماهی با استفاده از متانول- کلروفورم و آب با نسبت (٠/٨ : ١: ٢) خارج شد. استخراج DNA از نمونه ها به روش گوانیدین تیوسیانات – سلیکاژل (بوم[5] و همکاران ١٩٩٠) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش طیف سنجی[6] و روش مقایسه ای (ژل آگارز) تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز به صورت Multiplex با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(٤) نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان (جدول-١) به منظور بررسی آلودگی احتمالی نمونه های پودر ماهی به گونه های فوق، توسط دستگاه ترموسایکلر (T-Personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ٥٠ میکرولیتر و غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود: ١٠٠ mM Tris-HCl (pH 8.8)، ١/٥ U آنزیم Taq پلیمراز، ٠/١ میلی گرم بر میلی لیتر BSA[7]، ٠/٤ mM از هر dNTP، ٢/٥ mM از $MgCl_2$، ٢٠، ٥ و ٢٠ پیکامول به ترتیب از

[1] . Genetically modified organism
[2] . Transmissible Spongiform Encephalopathy
[3] . Chikuni
[4] . Meat and Bone Meal
[5] . Boom
[6] . Spectrophotometric method
[7] . Bovine Serum Albumin

Archive of SID

آغازگرهای نشخوارکنندگان، طیور و خوک سانان و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی زیر و در ۳۵ سیکل تکثیر شدند: ۹٤ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه، ۹٤ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی گراد برای ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ٦۰ دقیقه و با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شده و ژل پس از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید برای بررسی محصولات توسط اشعه ماورای بنفش بررسی شد.

جدول-۱ توالی آغازگرهای اختصاصی گونه

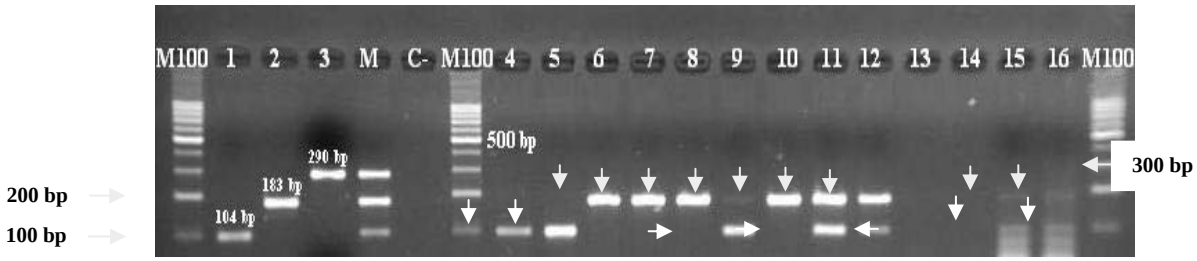
آغازگرها	گونه های تشخیصی	نواحی ژنی	توالی آغازگر ها	قطعات تولیدی (جفت باز)
Ruminant	گاو،گوسفند و بز	16S rRNA	**5´ GAA AGG ACA AGA GAA ATA AGG 3´** **5´ TAG GCC CTT TTC TAG GGC A 3´**	۱۰٤
Poultry	مرغ و بوقلمون	12S rRNA	**5´ TGA GAA CTA CGA GCA CAA AC 3´** **5´ GGG CTA TTG AGC TCA CTG TT 3´**	۱۸۳
Pork	خوک و گراز	12S rRNA-tRNA Val	**5´ CTA CAT AAG AAT ATC CAC CAC A 3´** **5´ ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT 3´**	۲۹۰

نتایج و بحث

نتایج نورسنجی نشان دادند 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 در کنترل منفی نشان دهنده دقت و صحت نتایج آزمایش است. در الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR با آغازگرهای اختصاصی خوک سانان هیچگونه باندی مشاهده نشد، لذا با توجه به اینکه 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 ۱۵ نمونه پودر ماهی آلودگی به بقایای بافتی نشخوارکنندگان و ۱۱ نمونه پودر ماهی آلودگی به بقایای بافتی طیور مشاهده شد که در شکل-۱ مشخص گردیده است. همچنین تعداد ۹ 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 (۱). از آنجاییکه DNA میتوکندریایی تعداد نسخه های زیادی به ازای هر سلول دارد (هزار نسخه و بیشتر)، مولکول های مناسبی برای آزمونهای تشخیصی با روش PCR هستند (۱). نتایج حاصله نشان دهنده ضرورت گنجاندن آزمون های مبتنی بر PCR در استاندارد ملی ایران برای افزایش کیفیت خوراک پروتئینی دام و طیور است. برای این منظور روش Multiplex که در این تحقیق استفاده و بهینه شد می‌تواند جهت کنترل سایر مواد غذایی به لحاظ بررسی تقلب مورد استفاده قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- الکتروفورز محصولات Multiplex PCR. شماره ۱ (DNA گاو)، شماره ۲ (DNA مرغ)، شماره ۳ (DNA خوک)، M Multiplex PCR، C کنترل منفی، شماره ۱۶ – ٤ (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 (۱۰۰۰–۹۰۰–۸۰۰–۷۰۰–۶۰۰–۵۰۰–٤۰۰–۳۰۰–۲۰۰–۱۰۰).

سپاسگزاری

از قطب علمی علوم دامی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد و همچنین آزمایشگاه بیوتکنولوژی جانوری پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) به سبب فراهم نمودن اعتبارات و امکانات پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Bellis, C., Ashton, K. J, Freney, L., Blair, B., and Griffiths, L. R. (2003). A molecular genetic approach for forensic animal species identification. Forensic Sci. Int. 134: 99-108.
2. Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim, P. M. E., and. Vandernoordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.
3. Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monma, M., and Saito, M. (1994). Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. Meat Sci. 37: 337-345.
4. Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., and Bottero, M. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol. Cell. Probes. 18: 81-87.
5. Francisco, J., Santaclara, E., Montserrat, E., Cabado, G., and Vieites, J. (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. Ghovvati, S., M. R. Nassiri, S. Z. Mirhoseini, A. H. Moussavi, and A. Javadmanesh. (xxx -Article In Press-xxx). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. doi:10.1016/j. Food Cont.
7. Gizzi, G., Van Raamsdonk, L. W. D, Baeten, V., Murray, I., Berben, G., Brambilla, G., and Von Holst, C. (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. Tartaglia, M., Saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G., and Battaglia, P. A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feed: a molecular approach to test for the presence of bovine derive materials. Food Protec. 61:513-518.
9. Woolfe, M., and Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Tren. in Biotech. 22(5): 222-226.