Archive of SID

نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۸ شماره ۳/ سال ۱۳۹۷/ صفحات ۴۷ تا ۵۶

تشخیص مولکولی گوشت الاغ در گوشت‌های چرخ‌کرده گاوی در شهر تبریز

پرویز حسن زاده*[۱]، اسماء دلدار[۲] و معصومه فیروز امندی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۴

[۱] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[۲] دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
[۳] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: p.hassanzadeh6@yahoo.com

چکیده

امروزه تمایل به استفاده از گوشت چرخ کرده به عنوان یکی از مواد غذایی خام در دسترس افزایش یافته است. با توجه به ارزش اقتصادی گوشت، احتمال استفاده از گوشت‌های غیرمجاز یا گوشت حیوانات دیگر در گوشت‌های چرخ کرده گاوی وجود دارد. روش‌های متعددی برای شناسایی تقلبات موجود در گوشت‌های چرخ کرده وجود دارد. یکی از مطمئن‌ترین روش‌ها آزمون‌های مولکولی مانند PCR می‌باشد. امروزه این روش به علت سرعت، سادگی، حساسیت و اختصاصی بودن کاربرد وسیعی پیدا کرده است. در مطالعه حاضر تعداد ۹۸ نمونه از گوشت‌های چرخ کرده موجود در سطح شهر تبریز جمع‌آوری گردید و سپس استخراج DNA با استفاده از روش فنول، کلروفرم و ایزوآمیل الکل، انجام شد. به منظور بررسی وجود گوشت گاو و الاغ، از پرایمرهای طراحی شده براساس ژن ND2 میتوکندریایی با طول قطعه bp۱۴۵ برای DNA الاغ و bp۲۷۴ برای DNA گاوی استفاده شد. از ۹۸ نمونه گوشت چرخ کرده بررسی شده از قسمت‌های مختلف شهر، تبریز تعداد ۷ نمونه نشان داده شد که آلوده به گوشت الاغ هستند.

واژگان کلیدی: گوشت الاغ، گوشت چرخ‌کرده گاوی، تشخیص مولکولی، شهر تبریز

مقدمه

یکی از گروه‌های مهم غذایی در تغذیه انسان گوشت و فرآورده‌های آن می‌باشد. غنی بودن گوشت از پروتئین-های ارزشمند حاوی اسیدهای آمینه ضروری برای بدن، مواد معدنی مانند آهن و روی، انواع ویتامین‌ها و نیز انرژی کافی سبب می‌شود تا آن را در زمره بهترین و کامل‌ترین مواد غذایی طبقه‌بندی نمایند (نوردهررکنی, ۱۳۹۳).

یکی از فرآورده‌های گوشتی محبوب در بسیاری از کشورها، گوشت چرخ‌کرده است که معمولا از گوشت گاو تهیه شده و در اختیار مردم قرار می‌گیرد. به علت گران بودن گوشت گاو، این امکان وجود دارد که تولیدکنندگان نسبت‌های بالاتری از میزان گوشتی که در محصولات خود به کار برده‌اند اعلام نموده و یا از گوشت سایر حیوانات مانند پستانداران، پرندگان و حیوانات دریایی در محصولات خود استفاده نمایند. (علی و همکاران ۲۰۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین گسترش بیماری‌هایی مانند آنفلوانزای مرغی در پرندگان توجه بیشتر مصرف‌کنندگان به سلامت فرآورده‌های گوشتی شده‌است. علاوه براین، تقلب در فرآورده‌های گوشتی نه تنها ازنظر بهداشتی بلکه از نظر اقتصادی نیز باعث آسیب به جامعه و درنتیجه سلب اطمینان از مصرف‌کنندگان می‌شود، و ضمنا از نظر اخلاقی، اعتقادات مذهبی و همچنین آلرژی افراد به گونه‌های گوشتی خاص نیز اهمیت دارد. درنتیجه این مسائل اهمیت شناسایی و تمایز منشاء گوشت را در فرآورده‌های گوشتی نمایان می‌سازد. (بای و همکاران ۲۰۱۵ و علیکرد و همکاران ۱۳۹۶). در طول دو دهه اخیر روش‌های متعددی برای شناسایی تقلبات موجود در فرآورده‌های گوشتی توسعه یافته‌است که هریک ازاین روش‌ها دارای مزایا و معایبی می‌باشند. ازجمله این روش‌ها می‌توان به اسپکتروسکوپی (UV، NIR، MIR، visible، Raman)، آنالیز ایزوتوپیک، کروماتوگرافی، بینی الکترونیکی، آنالیز حرارتی، روش‌های ایمونولوژیک (ELISA) و واکنش پلیمراز زنجیره‌ای (PCR) اشاره نمود (رید و همکاران ۲۰۰۶). با این حال ممکن است اغلب این روش‌ها برای احراز هویت گونه‌های نزدیک به هم از نظر ژنتیکی، و یا برای استفاده روزانه در گوشت‌های فرآوری شده مناسب نباشند، چراکه بعضی از این روش‌ها بسیار زمان‌بر هستند و همچنین امکان دارد پروتئین‌های موجود در گوشت در اثر استرس‌های حرارتی، فشار بالا و دیگر روش‌های فرآوری مواد غذایی دناتوره و تخریب شوند. (هو و همکاران ۲۰۱۵). اخیرا تکنیک‌های مولکولی قابل اطمینانی برای تشخیص گونه‌های موجود در گوشت توسعه یافته و بر بسیاری از مشکلات موجود در سایر روش‌های مرسوم غلبه کرده‌اند. به عنوان مثال روش multiplex PCR برای تشخیص همزمان ژن‌های هدف موجود در نشخوارکنندگان، پرندگان و خوک‌ها استفاده شده و باعث کاهش هزینه و زمان آزمایش گردیده است. (هو و همکاران ۲۰۱۵). تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، روشی قدرتمند، ساده و نسبتا سریع، با حساسیت و اختصاصیت بالا می‌باشد. این روش می‌تواند به صورت گسترده توسط سازمان‌ها و آزمایشگاه‌های کنترل مواد غذایی به‌عنوان روشی روزمره برای تشخیص تقلبات فرآورده‌های گوشتی خام و پخته استفاده شود. (روجاس و همکاران ۲۰۱۱).

هدف از این تحقیق تشخیص گوشت الاغ با استفاده از پرایمر اختصاصی این گونه در گوشت‌های چرخ‌کرده گاوی ارائه‌شده در سطح شهرستان تبریز با استفاده از روش مولکولی PCR و بررسی میزان کارآمدی این تکنیک به‌منظور تشخیص تقلبات فرآورده‌های گوشتی خام و پخته، در سازمان ها و دستگاه های نظارتی بهداشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها

ابتدا نمونه‌برداری از گوشت گاو و الاغ به عنوان نمونه شاهد انجام شد. سپس تعداد ۹۸ نمونه گوشت چرخ‌کرده از قصابی ها (۳۰ نمونه)، رستوران‌ها (۲۰ نمونه) و فروشگاه‌های زنجیره‌ای بخش‌های شمالی (۱۰ نمونه)، جنوبی (۱۵ نمونه)، شرقی (۱۰ نمونه) و غربی (۱۳ نمونه) شهر تبریز جمع‌آوری و در زیپ پک قرار داده شد. پس از نمونه‌برداری، تمامی نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکزی منتقل و در دمای ۲۰°C- شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، با استفاده از فنول، کلروفرم و ایزوآمیل الکل و با کلی تغییرات بر اساس تکنیک ارائه‌شده توسط Gilbert و Campos صورت گرفت. (کامپوس و گیلبرت ۲۰۱۲).

مقدار ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم از بافت گوشتی جداشده از گوشت چرخ‌کرده وزن شد و به میکروتیوب ۱/۵ ml انتقال یافت. مقدار ۲۰۰µl آب مقطر استریل به میکروتیوب افزوده شد و به‌خوبی ورتکس گردید. سپس میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰°C- قرار داده‌شد.

۵۰۰ ماکرولیتر محلول A (حاوی ۲۵۰µl محلول ۰/۱ مولار NaOH pH=12 و ۲۵۰µlمحلول SDS 1%) به میکروتیوب افزوده شد و مخلوط حاصل به‌خوبی

www.SID.ir

Archive of SID

ورتکس گردید. سپس میکروتیوب به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰°C گذاشته‌شد.۵۰۰ ماکرولیتر از محلول B (حاوی ۲۵۰µl فنول، ۲۴۰µl کلروفرم و ۱۰µl ایزوآمیل الکل) به مخلوط اضافه شده و سپس میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰rpm، سانتریفیوژ گردید. سه فاز در این مرحله مشاهده شد .فاز رویی توسط سمپلر برداشته شد و به میکروتیوب دیگری انتقال یافت. مقدار ۵۰۰µl کلروفرم به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید. میکروتیوب به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در این مرحله دو فاز مشاهده شد. فاز رویی به آرامی و با دقت برداشته‌شد و در میکروتیوب۱/۵میلی‌لیتری دیگری قرار گرفت. سپس به نسبت ۱- ۰/۶ برابر حجم محلول، ایزوپروپانول و به نسبت ۰/۱ حجم محلول، سدیم استات به میکروتیوب افزوده‌شد. میکروتیوب بلافاصله به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در این مرحله لکه DNA ته میکروتیوب مشاهده شد. سپس محلول رویی به آرامی دور ریخته‌شد و مقدار ۵۰۰-۱۰۰۰µl اتانول ۸۵ درصد به میکروتیوب اضافه- شد. میکروتیوب به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. سپس درب میکروتیوب باز شده و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه جهت تبخیر مایع در دمای محیط قرار داده‌شد. پس از تبخیر کامل مایع مقدار ۵۰µl آب مقطر استریل به میکروتیوب افزوده و جهت حل شدن کامل DNA به‌خوبی پیپتینگ شد. میکروتیوب به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵°C در آون قرار گرفت. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- ذخیره گردید. پس از استخراج DNA کیفیت و کمیت تمامی DNAهای استخراج‌شده با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و کمیت و کیفیت DNA حاصل از گوشت الاغ با روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید.

PCR

پرایمرهای الیگونوکلئوتید اختصاصی از ژنوم گاو به عنوان کنترل مثبت و ژنوم الاغ، بر طبق سکانس‌های موجود در بانک اطلاعات ژن، استفاده شد. توالی پرایمرهای تشخیصی برای این گونه‌ها به همراه محل آن‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده

نام گونه	توالی پرایمر	محل پرایمر
الاغ	5'-CATCCTACTAACTATAGCCGTG-3'	mitochondrial
	5'-GAATCCTGATAGTGGAGGGA -3'	genome
گاو	5'-GAGAGTTTCACTGTGCAG-3'	DQ187336.1
	5'-TTTAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3	

تکثیر PCR در حجم نهایی ۲۵ µl، شامل ۱۲/۵ µl مسترمیکس آماده از شرکت سیناکلون (Taq 2X Master Mix) ، ۵ µl DNA استخراج شده، ۱ µl از هر یک از پرایمرها از شرکت سیناکلون و ۵/۵ µl آب مقطر صورت گرفت. پس از این مرحله، نمونه‌های آماده‌شده برای تشخیص گوشت الاغ بر طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند:

مرحله واسرشت‌سازی اولیه DNA در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه طی ۱ چرخه، مرحله واسرشت‌سازی ثانویه DNA در دمای ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه طی ۳۵ چرخه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷°C به مدت ۵۰ ثانیه طی ۳۵ چرخه، مرحله گسترش آغازگر در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه طی ۳۵ چرخه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C، به مدت ۵ دقیقه طی ۱ چرخه (کسمن و همکاران ۲۰۰۷).

برنامه دمایی برای گوشت گاو نیز در ذیل ذکر شده است:

مرحله واسرشت‌سازی اولیه DNA در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه طی ۱ چرخه، مرحله واسرشت‌سازی ثانویه DNA در دمای ۹۴°C به مدت ۶۰ ثانیه طی ۳۵ چرخه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۶۸°C به مدت ۶۰ ثانیه طی ۳۵ چرخه، مرحله گسترش آغازگر در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه طی ۳۵ چرخه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C، به مدت ۱۰ دقیقه طی ۱ چرخه (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۲). محصولات PCR تا زمان انجام الکتروفورز، در دمای ۴°C نگهداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ شامل بافر 1X TBE مشخص و توسط دستگاه ژل داکیومنت با اشعه UV مشاهده گردید. PCR برای نمونه‌های مثبت سه بار تکرار شد (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۲).

نتایج

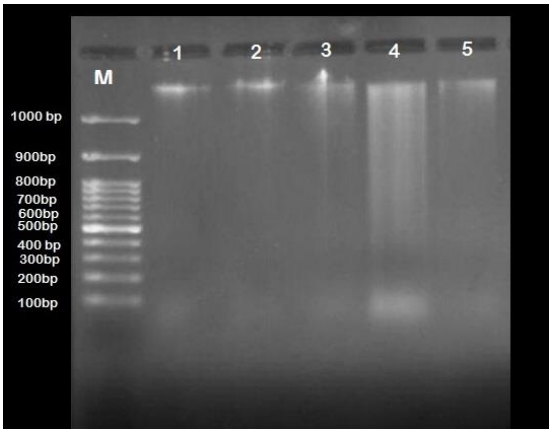
استخراج DNA

به‌منظور تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده از گوشت گاو به عنوان کنترل مثبت و گوشت الاغ، از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. کیفیت DNA استخراج شده از گوشت الاغ مطلوب و بین ۱/۸ تا ۲ بود. همچنین مقدار OD، ۵۰۷ نانوگرم بر میکرولیتر تعیین گردید، که نشان‌گر غلظت مناسب DNA موردنظر می‌باشد. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده نیز از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. نتایج حاصل از الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۱٪ در شکل ۱ قابل مشاهده است.

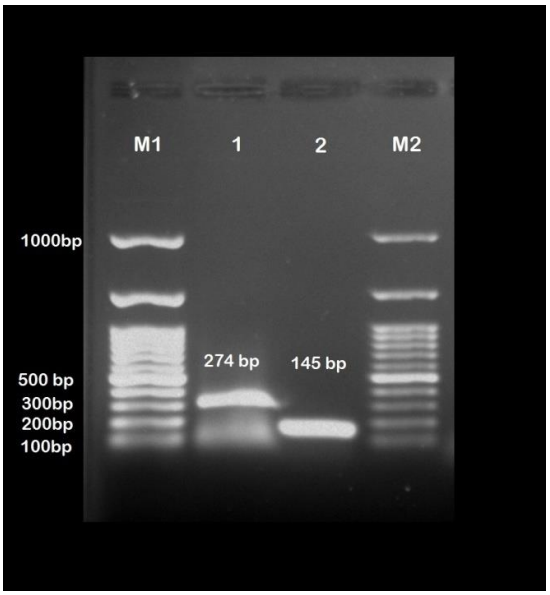
PCR اختصاصی

به‌منظور بررسی صحت وجود ژن میتوکندریایی DNA گاو به‌عنوان کنترل مثبت و الاغ، در DNAهای استخراج‌شده از گوشت خالص گاو والاغ و همچنین تعیین اندازه قطعه تکثیرشده (۲۷۴bp در گوشت گاو و ۱۴۵bpدر گوشت الاغ)، نمونه تکثیرشده به همراه یک DNA استاندارد بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد (شکل ۲).

سپس PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژنوم گاوی در نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده انجام شد و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ صورت گرفت. نتایج حاصل از تکثیر قطعه 274bp ناحیه ژن ND2 میتوکندریایی در شکل ۳ نشانگر وجود گوشت گاو در تمامی نمونه‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از تکثیر قطعه ۱۴۵bp ژن ND2 میتوکندریایی نیز در شکل ۴ نشانگر وجود گوشت الاغ در ۲ نمونه از نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده می‌باشد. آزمایش برای نمونه‌های مثبت، سه مرتبه تکرار شد تا از درست بودن نتایج اطمینان حاصل شود(شکل ۵).



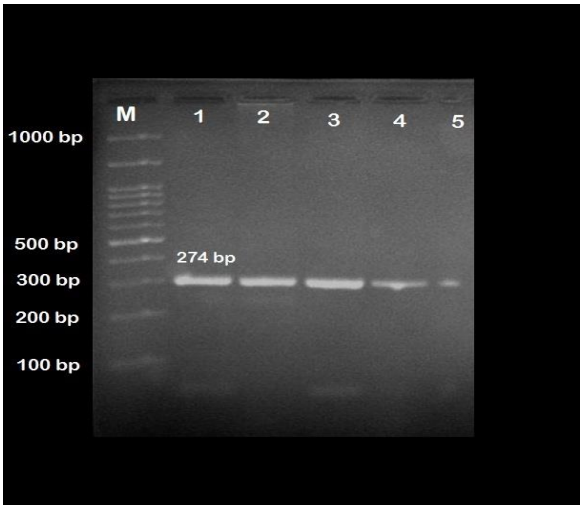
شکل ۱- الکتروفورز فرآورده‌های حاصل از استخراج DNA نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده بر روی ژل آگارز ۱٪. DNA Ladder:M از شرکت CinnaGen با میزان متوسط (۱۰۰bp-۱۰۰۰) ، شماره‌های ۱ تا ۵: باند حاصل از استخراج DNA



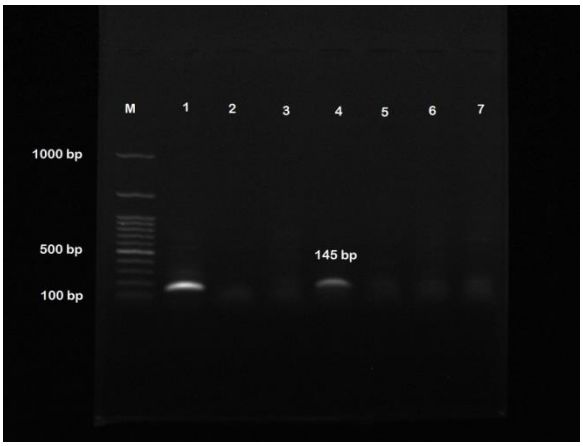
شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن گاو و الاغ بر روی ژل آگارز ۱٪. DNA Ladder:M1, M2 از شرکت CinnaGe با میزان متوسط (۱۰۰bp-۱۰۰۰) ، شماره ۱: باند حاصل از تکثیر ژن گاوی (274 bp) و شماره ۲: باند حاصل از تکثیر ژن الاغ (145 bp)

www.SID.ir

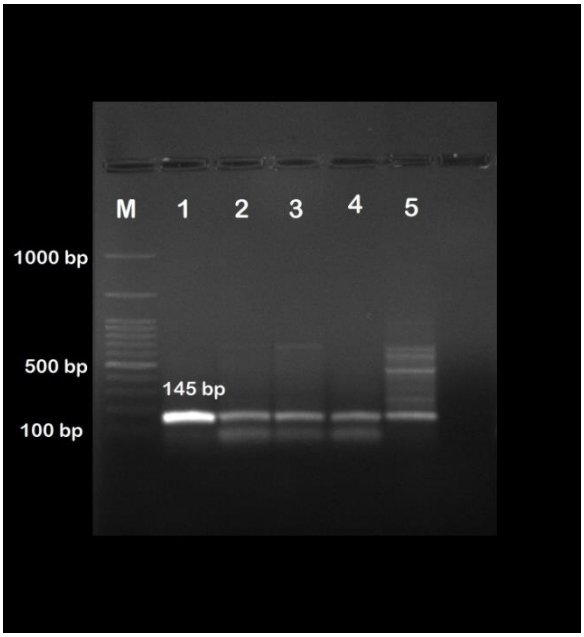
Archive of SID



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن گاو در نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده به عنوان کنترل مثبت بر روی ژل آگارز ۱٪ Ladder:M DNAاز شرکت CinnaGen با میزان متوسط (۱۰۰bp-۱۰۰۰) ، شماره ۱تا ۵ : باند حاصل از تکثیر ژن گاوی (274 bp)



شکل ۴- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن الاغ در نمونه های گوشت چرخ کرده بر روی ژل آگارز ۱٪ Ladder:M DNAاز شرکت CinnaGen با میزان متوسط (۱۰۰bp-۱۰۰۰) ، شماره ۱: نتیجه حاصل از PCR گوشت خالص الاغ. شماره ۲ تا ۷ : نتایج حاصل از تکثیر ژن الاغ (۱۴۵)



شکل ۵- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن الاغ در نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده بر روی ژل آگارز ۱٪. Ladder:M DNA از شرکت CinnaGen با میزان متوسط (۱۰۰bp-۱۰۰۰) ، شماره ۱: نتیجه حاصل از PCR گوشت خالص الاغ. شماره ۲ تا ۵: نتایج مثبت حاصل از تکثیر ژن الاغ (145 bp)، شماره ۶: کنترل منفی (در واکنش PCR به جای DNA از آب مقطر استفاده شد)

بحث

متاسفانه در سال‌های اخیر آمار تقلبات در تولید مواد غذایی ازجمله فرآورده‌های گوشتی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته‌است، به‌همین دلیل تشخیص اختصاصی گونه‌ها و شناسایی گروه‌های حیوانی مورد استفاده در مواد غذایی امری ضروری و مهم تلقی می-شود. در سال‌های اخیر از روش‌های گوناگون PCR برای شناسایی تقلبات ناشی از افزودن گوشت حیوانات مختلف در محصولات گوشتی استفاده شده‌است. از جمله این روش‌ها می‌توان به species-specific PCR، PCR-RFLP، real- time PCR، PCR-RAPD، DNA barcoding و PCR product sequencing اشاره نمود (علی و همکاران ۲۰۱۵).

در بررسی حاضر از تکنیک PCR خاص گونه‌ها برای شناسایی گونه‌های الاغ و گاو در گوشت چرخ‌کرده

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شد. پرچمی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۴) نیز برای تعیین وجود گوشت گاو و مرغ در سوسیس و کالباس-های گاوی جمع‌آوری‌شده از تهران، از روش PCR اختصاصی استفاده کردند. در این بررسی از ژن سیتوکروم b میتوکندریایی استفاده شد. نتایج نشان داد تمامی نمونه‌ها برخلاف برچسب‌شان حاوی آلایش مرغی بودند و احشای گاوی در پنج نمونه تشخیص داده‌شد.

قوتی و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از روش multiplex PCR، ۱۰ نمونه گوشت چرخ‌کرده، سوسیس و کالباس را از نظر وجود گوشت نشخوارکنندگان، پرندگان و خوک مورد بررسی قرار دادند. در هیچ یک از نمونه‌ها DNA خوک یافت نشد اما در ۴۰٪ از نمونه‌های سوسیس حضور گوشت پرندگان مشخص شد. همچنین هیچ یک از نمونه‌های گوشت چرخ‌کرده دارای آلایش مرغی نبودند.

مطالعه هو و همکاران (۲۰۱۵) برروی ۲۴ نمونه گوشت تجاری نشان داد به ترتیب ۶، ۲ و ۱ نمونه با مرغ، اردک و غاز ترکیب شده بودند. این بررسی با استفاده از DNA میتوکندریایی و روشmultiplex PCR صورت گرفت. اندازه قطعات مورد استفاده ۱۳۱bp،۲۸۳bp و ۳۸۷bp برای گوشت مرغ، اردک و غاز بود.

دمیرهان و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که از میان ۱۴ نمونه محصول غذایی از کشور آلمان ۲ نمونه حاوی ژلاتین خوک بودند و ۱ نمونه در بین ۲۹ نمونه از کشور ترکیه از نظر حضور گوشت خوک مثبت تشخیص داده شد.

در پژوهش حاضر، از جفت پرایمر طراحی‌شده براساس ژن ND2 میتوکندریایی برای تکثیر قطعات bp DNA ۲۷۴ و bp DNA ۱۴۵ به منظور تشخیص گونه‌های گوشتی گاو و الاغ استفاده شد. DNA میتوکندریایی دارای ویژگی‌های اختصاصی است که باعث کاربرد گسترده آن شده‌است. ازجمله مزایای ژنوم میتوکندریایی می‌توان به وراثت مادری، تعداد کپی‌های بالا از هر سلول، سرعت بالای جهش و نوترکیبی اندک و مقاومت حرارتی بالا اشاره نمود. تعداد کپی‌های فراوان DNA میتوکندریایی تضمین کننده کمیت زیاد و کافی محصول PCR حتی در زمان وجود مقدار کمی از نمونه‌های گوشت خام یا پخته‌شده می‌باشد، چراکه تعداد کپی‌های بالای DNA میتوکندریایی، کوچک، دورشته‌ای و حلقوی بودنشان در سلول، شانس بقای آنها تحت شرایط مختلف حرارتی را افزایش می‌دهد. در مطالعات متعدد اثرات روش‌های مختلف پخت بر روی تکثیر PCR ، DNA میتوکندریایی استخراج شده از گوشت و محصولات گوشتی بدون هیچ گونه اثرات نا-مطلوب، مورد بررسی قرار گرفته است (پرچمی نژاد و همکاران ۲۰۱۴). گزارش‌های متعددی از تشخیص تقلبات فرآورده‌های گوشتی و بررسی وجود گونه‌های حیوانی مختلف با استفاده از ژنوم میتوکندریایی وجود دارد. در پژوهش انجام‌شده توسط مانه و همکاران (۲۰۰۹) که با استفاده از روش species-specific PCR صورت گرفت، از ژن ND2 میتوکندریایی برای تکثیر قطعات bp 442 به منظور تشخیص گوشت مرغ استفاده شد. در بررسی‌های دیگر توسط بلاگامبا و همکاران (۲۰۰۱) و موراگایا و همکاران (۲۰۰۹)، از ژن cytochrome b، DNA میتوکندریایی و از روش PCR-RFLP برای تشخیص تقلبات محصولات گوشتی استفاده‌شد. موراگایا و همکاران (۲۰۰۹) نتیجه حاصل از تکثیر قطعات 359bp از ژن cytochrome b ۷ گونه گاو، گاومیش، خوک، بز، خرگوش، مرغ و بلدرچین را مناسب ارزیابی کرد.

گریش و همکاران (۲۰۰۵) نیز از PCR-RFLP برای تکثیر ژنوم میتوکندریایی 12s rRNA برای تشخیص گوشت گوسفند، بز و گاومیش استفاده نمود و بیان کرد این تکنیک بازده مناسبی را به‌منظور تشخیص تقلبات در فرآورده‌های گوشتی دارای چندین نوع گوشت ندارد.

نادیا و همکاران (۲۰۱۲) نیز از PCR-RFLP از ژن COI (زیر واحد یک سیتوکروم اکسیداز C) میتوکندری برای تشخیص گوشت خام گونه های گاو، مرغ، بوقلمون، گوسفند، خوک، گاومیش، شتر و الاغ استفاده کردند.

www.SID.ir

Archive of SID

اولین تحقیق درباره تشخیص حضور گوشت الاغ و اسب در فرآورده‌های گوشتی با استفاده از روش Real-time PCR توسط کیشولم و همکاران (۲۰۰۵) صورت گرفت. برای طراحی پرایمرها از ژنوم میتوکندریایی cytochrome b با طول قطعه 119bp برای گوشت الاغ و 69bp برای گوشت اسب استفاده شد. نتایج نشان داد تکنیک استفاده‌شده در این تحقیق برای تشخیص گونه‌های نزدیک به هم مانند اسب و الاغ کارآمد نبوده است.

ساوتورن و همکاران (۲۰۱۳) از تکنیک PCR و با استفاده از ژن‌های Cyt b، srRNA 12و ND2 برای تشخیص تقلب و اشتباه برچسب زدن محصولات گوشتی استفاده کردند. نتایج یافته‌ها نشان داد که ۶۸٪ از نمونه‌های مورد استفاده حاوی گونه‌هایی است که در برچسب محصول مشخص نشده اند.

در پژوهش حاضر نیز حضور گوشت الاغ در ۹۸ نمونه گوشت چرخ کرده جمع‌آوری‌شده از نقاط مختلف شهر تبریز بررسی شد و وجود DNA الاغ در ۷ نمونه به اثبات رسید.

همچنین یتیم و همکاران (۲۰۱۱) کیت تشخیص گوشت الاغ موجود در فرآورده‌های گوشتی را با استفاده از روش Real-time PCR ابداع کردند. این کیت قادر به شناسایی مقادیر بالاتر از ۰/۱ پیکوگرم DNA الاغ در محصولات گوشتی خام و حرارت‌دیده است.

هینیگ و همکاران(۲۰۱۵) یک تشخیص چندتایی PCR چهارگانه (Quadruple Multiplex PCR) برای تشخیص گوشت گاو، اردک، گوشت گوسفند و گوشت خوک در گوشت چرخ کرده استفاده کردند.

در پژوهشی دیگر در ۲۲۴ نمونه از انواع فرآورده‌های گوشتی جمع‌آوری شده از کارخانه‌های مختلف در ایران، ۱۷ نمونه دارای مقادیر متفاوتی از گوشت حرام از جمله الاغ و اسب بودند. در این بررسی از cytochrome b ژنوم میتوکندریایی و از روش PCR-RFLP استفاده شد. (دوستی و همکاران ۲۰۱۴).

فلورن و همکاران (۲۰۱۴) از روش PCR دیجیتال قطره ای (ddPCR) برای شناسایی و تعیین گونه در محصولات گوشتی فراوری شده گاو، اسب و خوک استفاده کردند.

نتایج PCR-RFLP بررسی عبدالرحمن و همکاران (۲۰۰۹) نشانگر دارابودن قدرت تشخیص این روش میان گونه‌های نزدیک به هم (الاغ و اسب) است. اندازه قطعه استفاده شده برای گوشت الاغ 221bp بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان بیان کرد که امکان حضور بافت‌های حیوانی غیرمجاز در فرآورده‌های گوشتی (گوشت چرخ‌کرده) موجود در بازار تبریز وجود دارد. لذا ضرورت به‌کارگیری روش-هایی دقیق در سازمان‌ها و دستگاه‌های نظارتی بهداشتی کشور احساس می‌شود. تکنیک‌های مولکولی مانند PCR از کارایی بالایی در تشخیص تقلبات در فرآورده‌های گوشتی برخوردار هستند و امکان استفاده روزمره از آنها وجود دارد. امید است با فراهم نمودن زمینه تشخیص دقیق‌تر تقلبات و نظارت دقیق بهداشتی در محصولات غذایی شاهد کاهش هرچه بیشتر این معضل در سطح کشور باشیم.

منابع مورد استفاده

رکنی نوردهر، ۱۳۹۳. علوم و صنایع گوشت. انتشارات دانشگاه تهران.

علیکرد م، ممتاز ح، یادگارفر ق، کرامت ج و همایونی‌راد ع. ۱۳۹۶. تشخیص تقلب نوع گوشت مصرفی در فراوردههای گوشتی. پژوهش‌های صنایع غذایی، جلد ۲۷، شماره ۴. صفحه‌های ۷۳ تا ۸۶.

Abdel-Rahman S, El-Saadani M, Ashry K, Haggag A, 2009. Detection of adulteration and identification of cat's, dog's, donkey's and horse's meat using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 3(3): 9-1716.

www.SID.ir

Archive of SID

Ali ME, Razzak MA, Hamid SBA, Rahman MM, Al Amin M, Rashid NRA, 2015. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. Food chemistry 24: 177-214.

Bai W, Xu W, Huang K, Yuan Y, Cao S, Luo Y,2009. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. Food Control 20(4): 70-366.

Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfrè F, 2001. Identification of Species in Animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction− Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA. Journal of agricultural and food chemistry 49(8): 81-3775.

Campos PF, Gilbert TM, 2012. DNA extraction from formalin-fixed material. Ancient DNA: Methods and Protocols 5: 81.

Cawthorn DM, Harris AS, Louwrens CH, 2013. A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. Food Control 32: 440- 449.

Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H, 2005. The detection of horse and donkey using real-time PCR. Meat science 70(4): 32-727.

Demirhan Y, Ulca P, Senyuva HZ, 2012. Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products—Halal/Kosher authentication. Meat science 90(3): 686.

Doosti A, Dehkordi PG, Rahimi E, 2014. Molecular assay to fraud identification of meat products. Journal of food science and technology 51(1): 52-148.

Ghovvati S, Nassiri M, Mirhoseini S, Moussavi AH, Javadmanesh A, 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control 20(8):9-696.

Floren C, Wiedemann I, Brenig B, Schütz E, Beck J, 2014. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). Food Chemistry 173:1054–1058

Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Shivakumar BM, Anand M, Patel M, et al, 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. Meat Science 70(1): 12-107.

Haining He, Xia Hong, Yusheng Feng, Yongsong Wang, Jin Ying, Qi Liu, Yingwen Qian, Xinkui Zhou, Dongshuai Wang, 2015. Application of Quadruple Multiplex PCR Detection for Beef, Duck, Mutton and Pork in Mixed Meat. Journal of Food and Nutrition Research 3(6): 392-398.

Hou B, Meng X, Zhang L, Guo J, Li S, Jin H, 2015. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. Meat Science 4: 90-101.

Ibrahim EA, Allam NA, Kotb EE, El-Rafey GA, El-Deen MM, Fadlallah MG. 2012. Sequence-Based Typing-Study on the Relationship Between Subclinical Mastitis and BoLA-DRB3. 2* Allelic Polymorphism in Egyptian Cows. Global Veterinaria 9 (1): 08-22.

Kesmen Z, Sahin F, Yetim H, 2007. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. Meat Science 77: 649–653.

Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK, 2009. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. Food Chemistry 116(3): 10-806.

Murugaiah C, Noor ZM, Mastakim M, Bilung LM, Selamat J, Radu S, 2009. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. Meat Science 83(1): 61-57.

Nadia Haider, Imad Nabulsi, Bassam Al-Safadi, 2012. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. Meat Science 90: 490–493.

Parchami Nejad F, Hosseni S.E, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M, Sharifan, A, 2014. Fraud identification in beef sausage in Tehran province using mitochondrial genes of animal species. Journal of Food Hygiene 4(13): 81-97.

Reid LM, O'Donnell CP, Downey G, 2006. Recent technological advances for the determination of food authenticity. Trends in Food Science & Technology 17(7): 53-344.

Rojas M, Gonzalez I, Pavón MA, Pegels N, Hernandez PE, Garcia T, et al, 2011. Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (Struthio camelus) mislabelling in meat products from the retail market. Food Control 22:31-523.

www.SID.ir

Archive of SID

Safdar M, Junejo Y, 2015. A multiplex-conventional PCR assay for bovine, ovine, caprine and fish species identification in feedstuffs: highly sensitive and specific. Food Control 4: 50-190.

Yetim H, Sahin F, Kesmen Z, 2011. Kit useful for detecting of donkey meat present in meat. Google Patents.

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular detection of donkey meat in minced beef in Tabriz city

P Hassanzadeh[1*], A Deldar[2] and M Firouzamandi[3]

Received: June 3, 2017 Accepted: December 5, 2017

[1]Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]DVM Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: E mail: p.hassanzadeh6@yahoo.com

Abstract

Today, the desire to use minced meat has grown as one of the available raw foods. Due to the economic value of meat, there is the likelihood of using unauthorized meat or other meat in minced meat. There are several methods to detect adulteration in ground meat. One of the best methods for detecting these adulterations is molecular tests like PCR. Today, this technique has been widely used because of its speed, simplicity, sensitivity and specificity. In this research, it was used of polymerase chain reaction (PCR) technique to detect adulteration in minced meats collected from Tabriz. The PCR primers were designed based on the ND2 sequence of mitochondrial genes of donkey and genome of cow. Amplification sizes were 145 and 274 bp for donkey and cow respectively. Screening of 98 commercial minced meats collected from different parts of Tabriz, 7 samples were showed which have contamination with donkey meat.

Keyword: Donkey meat, Minced beef, Molecular detection

www.SID.ir