

S rRNA^{۱۲} و پودر ماهی با استفاده از توالی‌های ژنی

و S rRNA^{۱۶} از DNA میتوکندری

شاهرخ قوتی رودسری^{*}^۱، محمد رضا نصیری^۱، سید ضیاء الدین میرحسینی^۲ و مجتبی طهمورث پور، علیرضا هروی موسوی^۱، علی جواد منش^۱، مهدی سلطانی^۱، حسن عباسی^۱ و محمد دوستی^۱

۱- قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد صندوق پستی

۹۱۷۷۵-۱۱۶۳

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور

۳- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

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

چکیده

شناسایی گونه‌های حیوانی استفاده شده در تهیه پودر ماهی به لحاظ اقتصادی و بهداشتی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. 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 کارخانه‌های مختلف تعداد ۲۰ نمونه جمع آوری شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش گوانیدین تیوسبیانات- سیلیکاژل صورت گرفت. قطعات ۱۰۰، ۱۸۳ و ۲۹۰ و جفت بازی به ترتیب برای نشخوارکنندگان (گاو، گوسفند و بز)، طیور (مرغ و بوقلمون) و خوک سانان (اهلی و وحشی) از نواحی ژنی S^{۱۲} rRNA و DNA-S rRNA^{۱۶} و آغازگرهای 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 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 نشخوارکنندگان و طیور در پودر ماهی ۴۰ درصد برآورد شد.

واژه‌های کلیدی

تشخیص تقلب،
DNA میتوکندری،
پودر ماهی،
۱2S rRNA،
۱6S rRNA،
Multiplex PCR

مقدمه

خوراک حیوانات چهار دسته از حیوانات (۳ گونه نشخوار کننده، ۲ گونه پرنده، خوک سانان و ۱۲ گونه ماهی) را شناسایی نمودند که نتایج وجود تقلب در مواد خوراکی را اثبات کردند (۴). قوتی و همکاران (۲۰۰۸) با تاکید بر نواحی ژنی متفاوت DNA میتوکندری (12S rRNA و 16S rRNA) و آزمودن نمونه‌های مواد غذایی (سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده) نسبت به شناسایی و ردیابی گونه‌ای حیوانی استفاده شده اقدام نمودند که نتایج نشان از اعمال تقلب در برخی از این فرآورده‌های غذایی صنعتی داشت (۶). هدف اصلی از این تحقیق توسعه و بهینه نمودن Multiplex PCR از نواحی ژنی 12S rRNA و 16S rRNA برای تشخیص اختصاصی نشخوار کننده‌گان، طیور و خوک سانان در پودر ماهی بود. به کمک این روش نیز می‌توان گونه‌های حیوانی استفاده شده در سایر مواد خوراکی را نیز از یکدیگر تمیز نمود.

مواد و روش‌ها

پس از همگن‌سازی نمونه‌ها با ازت مایع، روغن و چربی از پودر ماهی با استفاده از متانول-کلروفورم و آب با نسبت (۵:۱) (۲) خارج شد. استخراج DNA از نمونه‌ها به روش گوانیدین‌تیوسیانات - سلیکاژل (بوم^۵ و همکاران ۱۹۹۰) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش طیف سنجی^۶ و روش مقایسه‌ای (ژل آکارز) تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت Multiplex با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (۴) نشخوار کننده‌گان، طیور و خوک سانان (جدول-۱) به منظور بررسی آلودگی احتمالی نمونه‌های پودر ماهی به گونه‌های فوق، توسط دستگاه ترموسایکلر (T-Personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود: ۰/۱ mM Tris-HCl (pH 8.8)، ۱۰۰ mM BSA^۷، ۰/۴ mM dNTP^۸ از هر Taq پلیمراز، ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر^۹ dNTP^{۱۰} از هر ۲۰ mM MgCl₂ از ۲/۵ mM dNTP^{۱۱} و ۲۰ پیکامول به ترتیب از

تولید کننده‌گان و پرورش دهنده‌گان 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 زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۶). بیماری‌هایی چون جنون گاوی و آنفولانزای مرغی، سوء استفاده بعضی تولیدکننده‌گان مواد غذایی و خوراکی، دلایل مذهبی، حساسیت‌های غذایی و غذاهای ترانس ژنیک (GMO)^۱ باعث افزایش نگرانی مردم در خصوص ترکیبات محصولات غذایی و خوراکی شده است (۵ و ۹). 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 همه مصرف کننده‌گان و تولید کننده‌گان در برابر تعویض و تقلبات غیر قانونی حمایت شوند. تشخیص اختصاصی گونه‌ها و شناسایی گروه‌های حیوانی از قبیل نشخوار کننده‌گان (جهت حفظ سلامت عمومی و جلوگیری از گسترش بیماریهای^۲ (TSE) بر اساس قوانین اتحادیه اروپا جهت آزمون سالم بودن تولیدات پروتئینی حیوانی در مواد غذایی و خوراک دام و طیور استفاده می‌شود (۵ و ۷). از جمله مزیتهاز روش PCR نسبت به سایر روش‌ها می‌توان دقت و سرعت زیاد، حساسیت بالا و انعطاف پذیری این روش نسبت به سایر روش‌ها اشاره کرد (۶). برای نخستین بار چیکونی^۳ (۱۹۹۴) از روش PCR جهت شناسایی تقلب در گوشت و فرآورده‌های گوشتی جانوران اهلی استفاده نمود (۳). سپس در سال ۱۹۹۸ یک آزمایش PCR با توان شناسایی بافت نشخوار کننده‌گان در گوشت و استخوان دام و طیور (MBM)^۴ ابداع شد (۸). دالماسو و همکاران (۲۰۰۴) با طراحی آغازگرهای اختصاصی از نواحی متفاوت DNA میتوکندری (12S rRNA و 16S rRNA) جهت تشخیص تقلب در

¹. Genetically modified organism². Transmissible Spongiform Encephalopathy³. Chikuni⁴. Meat and Bone Meal⁵. Boom⁶. Spectrophotometric method⁷. Bovine Serum Albumin

دقيقه. محصولات PCR بر روی ژل آکارز ۲٪ به مدت ۶۰ دقيقه و با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شده و ژل پس از رنگ آميزی توسط اتیدیوم بروماید برای بررسی محصولات توسط اشعه ماورای بینفشن بررسی شد.

آغازگرهای نشخوارکنندگان، طیور و خوک سانان و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی زیر و در ۳۵ سیکل تکثیر شدن: ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰

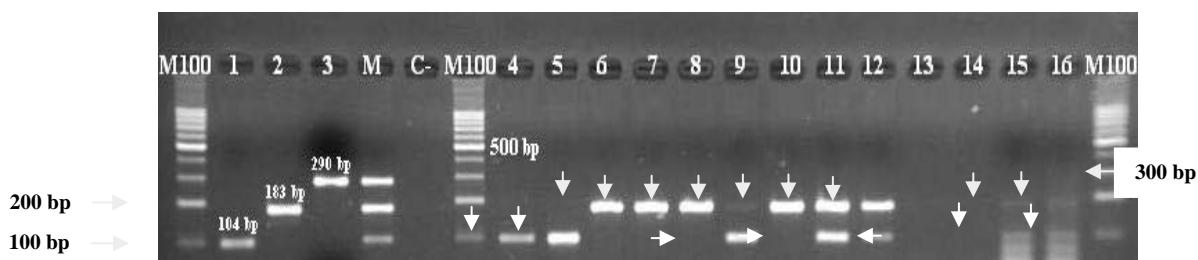
جدول-۱ توالی آغازگرهای اختصاصی گونه

قطعات تولیدی (جفت باز)	توالی آغازگرها	نواحی زنی	گونه های تشخیصی	آغازگرها
104	5' GAA AGG ACA AGA GAA ATA AGG 3' 5' TAG GCC CTT TTC TAG GGC A 3' 5' TGA GAA CTA CGA GCA CAA AC 3' 5' GGG CTA TTG AGC TCA CTG TT 3' 5' CTA CAT AAG AAT ATC CAC CAC A 3'	16S rRNA	گاو، گوسفند و بز	Ruminant
183	5' ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT 3'	12S rRNA	مرغ و بوقلمون	Poultry
290	5' ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT 3'	12S rRNA-tRNA Val	خوک و گراز	Pork

بقدامی بافتی طیور مشاهده شد که در شکل ۱-۱ مشخص گردیده است. همچنین تعداد ۹ نمونه از پودرهای ماهی جمع آوری شده آلودگی مشترک به بقدامی 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 می تواند جهت کنترل سایر مواد غذایی به لحاظ بررسی تقلیل مورد استفاده قرار گیرد.

نتائج

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 الکتروفوروز ژل آکارز 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



شکل ۱ - الکتروفورز محصولات Multiplex PCR. شماره ۱ (گاو)، شماره ۲ (DNA مرغ)، شماره ۳ (خوک)، M⁺ PCR و M⁻ PCR کنترل مثبت، شماره ۴ (نمونه های پودر ماهی)، M100 نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR اندازه باندهای نشانگر وزنی از بالا به پایین بر حسب bp به قرار زیر می باشد (۱۰۰۰-۸۰۰-۶۰۰-۵۰۰-۴۰۰-۳۰۰-۲۰۰-۱۰۰).

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

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 derived 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.

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.foodcont.