تشخیص تقلبات در محصولات گوشتی مبتنی بر توالی DNA

شهره آریائی‌نژاد*،[1] کاوه کاوسی[2] لیلا فتوحی[2] و علی‌اکبر موسوی موحدی[2]

چکیده

امروزه اختلاط در فراورده‌های گوشتی بالأخص محصولات چرخ شده و فراوری‌شده، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات برخی واحدهای تولیدی در بخش صنایع غذایی بشمار می‌رود. مشخص شدن آزمون تعیین گونه گوشت به سبب اطمینان برای مصرف‌کنندگان و همچنین کارخانه‌هایی که در تهیه محصولات خود از منابع پروتئین دامی بهره می‌برند بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در دهه اخیر روش‌های نوین زیست‌فناوری امکان کنترل سلامتی و جلوگیری از تقلبات تولیدکنندگان مواد غذایی را فراهم نموده است و به‌نوعی کنترل کیفیت و حمایت از سلامتی مصرف‌کنندگان را نوید می‌دهد. از میان روش‌های نوین زیستی که جهت تشخیص نوع گوشت مصرفی استفاده می‌گردد، روش‌های ژنتیکی از صحت و دقت بالایی برخوردار است، زیرا علاوه بر سریع و دقیق بودن این امکان را می‌دهد که محتوای گوشت‌های مخلوط فراوری‌شده نظیر همبرگر، سوسیس، کالباس، کباب و... نیز شناسایی گردند. یکی از روش‌های پیشنهادی در این طرح تعیین نوع گوشت با استفاده از ژن سیتوکروم b میتوکندری و با استفاده از روش PCR می‌باشد. در این روش می‌توان پس از استخراج DNA از بافت گوشتی مورد مطالعه، با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن سیتوکروم b ، واکنش PCR جهت تکثیر ژن مورد نظر انجام می‌گیرد، از این روش می‌توان به محتوای گوشت‌های مخلوط پی برد. این روش به علت سرعت، سادگی، حساسیت و اختصاصی بودن، پتانسیل بالایی برای تشخیص نوع گوشت دارد و همچنین محدودیتی در استفاده از گوشت‌های فناوری شده هم ایجاد نمی‌کند.

واژگان کلیدی: ژن سیتوکروم b، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR، گوشت مخلوط فراوری‌شده، DNA، تشخیص تقلب

* عهده دار مکاتبات، استادیار، تلفن: ۰۲۶۳۲۷۰۳۵۳۶ ، نمابر: ۰۲۶۳۲۷۰۱۰۶۷، آدرس الکترونیکی: sh.ariaee@abrii.ac.ir

[1] پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

[2] مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

مقدمه

امروزه با تغییراتی که در نحوه زندگی افراد جامعه به وجود آمده است، غذاهای آماده و فراوری‌شده به‌شدت مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که تعداد رستوران‌ها و مراکز توزیع و تهیه غذا در کشورمان به صورت قابل‌توجهی در حال افزایش می‌باشند. تولیدکنندگان مواد غذایی همواره درصدد یافتن روش‌هایی برای کاهش هزینه مواد اولیه مورد استفاده خود می‌باشند تا از این طریق بتوانند منافع مالی خود را افزایش دهند و بدین دلیل در سال‌های اخیر آمار تقلبات در عرضه مواد غذایی افزایش قابل‌توجهی یافته است. درهر حال برای مصرف‌کنندگان همواره معیارهای همچون باورهای دینی، سلامتی محصول، طعم و مزه آن و همچنین پرهیز از مصرف مواد حساسیت‌زا و درنهایت قدرت خرید، میزان استقبال از مصرف یک ماده غذایی را تحت تأثیر قرار داده است.

در دهه اخیر روش‌های نوین زیست‌فناوری امکان کنترل و جلوگیری از تقلبات تولیدکنندگان مواد غذایی را فراهم نموده است و به‌نوعی کنترل کیفیت و حمایت از سلامتی مصرف‌کنندگان را نوید می‌دهد[۱]. با استفاده از روش‌های زیست‌فناوری می‌توان وجود ۱۰۰ نانوگرم از یک ماده را در محصولات غذایی تشخیص داد. با توجه به اهمیت بالای کنترل دارو و مواد غذایی، نمونه‌هایی از دستاوردهای کاربردی این علم در کنترل و نظارت بر تولیدات غذایی می‌باشد. تقلبات در فروش گوشت چه به‌صورت خام و چه در مواد غذایی از عمده‌ترین مسائلی است که به‌وفور دیده می‌شود.

جنبه‌های مختلفی مثل منبع گوشت، قیمت، سیستم‌های تولیدی و ایمنی بر مقبولیت گوشت به‌وسیله مصرف‌کننده اثر می‌گذارند. تقاضا و قیمت گوشت با توجه به منابع حیوانی متنوع است. جایگزینی گوشت گران‌تر با گوشت ارزان‌تر یکی از مهم‌ترین مشکلات بزرگ صنعت گوشت است. شناسایی منشأ گوشت گونه‌های حیوانی خصوصاً جهت آنالیز مواد غذایی و همچنین رعایت برخی از مقررات دینی بسیار مهم است. اصطلاح گوشت گونه‌های حیوانی[1] به طیف گسترده‌ای از گونه‌های حیوانی پستانداران، پرندگان و حیوانات دریایی اشاره دارد.

مقررات برچسب‌زنی مواد غذایی نیازمند این است که گوشت گونه‌های حیوانی در محصولات گوشتی به‌درستی و با دقت به مصرف‌کننده اعلام شود؛ که این موضوع منجر به پیدایش روش‌های قابل‌اعتماد و مخصوص برای تعیین گوشت گونه‌های حیوانی در محصولات مختلف غذایی شده است، زیرا گوشت در این محصولات در طی فرآوری، خرد شده و با دیگر ترکیبات مخلوط می‌شود و تحت فرایند حرارتی قرار می‌گیرد؛ زیرا که مواد اولیه پس از مخلوط شدن و یکنواخت شدن، در ظاهر قابل‌شناسایی نیستند[۲].

روش‌های آنالیتیکی تشخیص نوع گوشت، روش‌های مبتنی بر DNA و پروتئین می‌باشد. با استفاده از پروتئین استخراج شده از گوشت گوسفند تازه ذبح شده، مطالعاتی در خصوص تأثیر ذبح حلال بر کیفیت گوشت انجام‌شده و فواید این ذبح بررسی گردیده است [۳]. به‌طورکلی روش‌های مبتنی بر پروتئین محدودیت دارد زیرا پروتئین با حرارت ساختار خود را از دست می‌دهد، بنابراین نمی‌تواند برای گوشت‌های فناوری شده مورد استفاده قرار گیرد. از میان روش‌های نوین زیستی که جهت تشخیص نوع گوشت مصرفی استفاده می‌گردد، روش‌های ژنتیکی از صحت و دقت بالایی برخوردار است [۵-۴]، زیرا علاوه بر سریع و دقیق بودن این امکان را می‌دهد که حتی گوشت‌های فراوری‌شده نظیر همبرگر، سوسیس، کالباس ، کباب و... نیز شناسایی گردند[۶]. روش‌های مولکولی جهت تشخیص نوع گوشت به‌سرعت در حال پیشرفت می‌باشد به‌طوری‌که امروزه می‌توان چند نوع گوشت را با یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR تشخیص داد[۷-۹].

در این تحقیق برای شناسایی گونه‌های گوشتی از DNA میتوکندری استفاده شد؛ زیرا این ماده وراثتی با تعداد کپی‌های بالا در هر سلول موجود می‌باشد و به‌ندرت دچار نوترکیبی می‌شود و منحصربه‌فرد است. این اطلاعات وراثتی می‌تواند برای شناسایی گونه‌ها استفاده شود و به این علت برای شناسایی گونه‌های گوشتی مورد استفاده قرار گرفت[۱۰]. در مطالعات متعدد اثرات روش‌های مختلف پخت بر روی تکثیر

[1] Meat species

PCR، DNA میتوکندریایی استخراج‌شده از محصولات گوشتی بررسی شده است و هیچ اثر نامطلوبی دیده نشده است[۱۱-۱۳]. در این تحقیق تعیین نوع گوشت با استفاده از ژن سیتوکروم b میتوکندری و با استفاده از روش PCR انجام شد[۱۴]. در این روش پس از استخراج DNA از بافت گوشتی مورد مطالعه، با استفاده از پرایمرهای تخصصی طراحی شده برای ژن سیتوکروم b ، واکنش PCR جهت تکثیر ژن مورد صورت گرفت[۱۵-۱۷].

مواد و روش‌ها

۱- تهیه انواع گوشت در تقلبات غذایی

با توجه به اهمیت بالای کنترل دارو و مواد غذایی، نمونه‌هایی از دستاورد های کاربردی این علم در کنترل و نظارت بر تولیدات غذایی می‌باشد. تقلبات در فروش گوشت چه به‌صورت خام و چه در مواد فراوری‌شده از عمده‌ترین مسائلی است که به‌وفور دیده می‌شود. این تقلبات به‌صورت استفاده از گوشت گونه غیرمتعارف (عمدتاً در رستوران‌های بین‌راهی و گوشت‌های فراوری‌شده) و همچنین تقلب در نوع گوشت می‌باشد.

در گام نخست، بررسی و مطالعه در زمینه شناسایی نوع گوشت‌هایی که به‌عنوان تقلب در محصولات مختلف گوشتی در کشور عرضه می‌گردد، صورت گرفت. بر حسب گزارش‌های حاصله در خصوص تقلب‌های انجام‌شده، گوشت‌های گاو، گوسفند، سگ، بز، گربه، خر، خوک، بوفالو، مرغ و شتر عنوان گردیده است. با توجه به اینکه در کشور ما اغلب مردم از گوشت گوسفند، گاو، جوجه و شتر جهت تغذیه استفاده می‌کنند در کل مجموع ده نوع گوشت جهت شناسایی در نظر گرفته شد.

۲- استخراج DNA از نمونه گوشت‌های انتخاب‌شده و بررسی کیفیت DNA استخراج‌شده

جهت استخراج DNA نمونه‌های مختلف گوشت، از کیت استخراج بافت DNA محصول شرکت "این ویتروژن" استفاده شد. در نهایت غلظت نمونه‌های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ مشخص گردید. جهت تعیین خلوص و کیفیت DNA استخراج شده به کمک دستگاه نانودراپ نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. برای حصول اطمینان از هر نمونه ۵ ویال جهت استخراج آماده گردید. نمونه‌هایی که از نظر کیفیت DNA مناسب بودند برای گام بعدی و واکنش زنجیره پلیمراز PCR انتخاب گردید.

۳- پیدا کردن توالی ژن سیتوکروم b در انواع مختلف گوشت جهت طراحی پرایمرهای دژنره

توالی‌های موجود از ژن سیتوکروم b موجودات گوسفند، گاو، بوفالو، شتر، بز، جوجه، سگ، گربه، خوک و خر جهت طراحی پرایمر از پایگاه اطلاعات زیست‌فناوری NCBI[1] جمع‌آوری گردید. توسط نرم‌افزار Geneious و جمع‌آوری تمام توالی‌های نوکلئوتیدی هر جنس و یا نوع، بررسی و هم‌ترازی توالی‌های[2] نوکلئوتیدی جهت طراحی پرایمر دژنره[3] (پرایمری است که در یک یا چند نقطه از آن احتمال حضور چندین نوکلئوتید به‌طور هم‌زمان وجود داشته باشد) برای تکثیر قطعه مورد نظر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR به صورت جداگانه انجام شد. توسط نرم‌افزار های Gene Runner و Oligo پرایمر های طراحی‌شده پیشنهادی از نظر اطلاعاتی از قبیل درصد GC ، پایداری دایمرهای خودی و ساختار ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان نهایی از صحت پرایمر های طراحی شده توسط سایت NCBI و گزینه primer blast توالی پرایمرها جهت اطمینان برای اتصال به ژن مورد نظر بررسی گردید و پرایمرهای نهایی شده جهت سنتز به شرکت‌های مرتبط ارسال شد. با در اختیار داشتن DNA نمونه‌ها و پرایمر تخصصی و مواد موردنیاز به‌وسیله واکنش زنجیره پلیمراز PCR انواع گوشت شناسایی گردید.

نتایج

نمونه‌های ده گوشت گاو، گوسفند، سگ، بز، گربه، خر، خوک، بوفالو، مرغ و شتر با استفاده از روش مولکولی به‌وسیله تکثیر قطعات ژن cytb در هر نمونه و مشاهده آن بر روی ژل آگارز

[1] National Center for Biotechnology Information
[2] Sequences alignment
[3] Degenerate primer

جهت بهینه‌سازی نتایج به دست آمده، کاهش هزینه و زمان آزمایش با طراحی واکنش زنجیرهای پلیمراز مرکب[1] با ا ستفاده از چهار مخلوط ده نوع گوشت شناسایی شد. به‌این‌ترتیب هزینه به مقدار کمتر از نصف کاهش یافت.

نتایج به د ست آمده از این تحقیق ن شان می‌دهد می‌توان از این نتایج در قالب یک کیت تشخیص انواع گوشت به روش مولکولی استفاده گردد و قابل تجاری‌سازی می‌باشد.

با توجه به اینکه هم‌اکنون این کیت به‌صورت وارداتی به ایران عرضه می‌گردد و همچنین شرایط دشوار ارزی کشور برای خرید این محصول به دست آمده از این طرح می‌تواند گام مؤثری در تجارت سازی این کیت باشد.

سپاس

در انتها نهایت تشکر را از مو سسه ملی تو سعه تحقیقات علوم پزشکی جهت فراهم آوردن امکان این تحقیق و نتایج حاصل را اعلام می‌دارد.

منابع و مؤاخذ

[1]. Bottero MT, Dalmasso A (2011) Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. The Veterinary Journal 190: 34-38.

[2]. Mafra I, Roxo A, Ferreira IM, Oliveira MBP (2007) A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. International Dairy Journal 17: 1132-1138.

[۳].رقیه ستاری، الناز حسینی، لیلا فتوحی، شهره آریائی نژاد، علی خطیبی، علی اکبر موسوی موحدی (۱۳۹۴) " تأثیر ذبح حلال بر کیفیت گوشت و مقایسه با سایر کشتارها ". نشریه نشاء علم، سال پنجم، شماره دوم. ص ۳۹-۳۵

[4]. Ilhak OI, Arslan A (2007) Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 31: 159-163.

[5]. Saez R, Sanz Y, Toldra F (2004) PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. Meat Science 66: 659-665.

[6]. Man YC, Aida A, Raha A, Son R (2007) Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. Food Control 18: 885-889.

[7]. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P (2014) Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. Food Chemistry 163: 77-82.

[8]. Calvo J, Zaragoza P, Osta R (2001) A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. Journal of Animal Science 79: 2108-2112.

[9]. Mane B, Mendiratta S, Tiwari A, Bhilegaokar K (2012) Detection of adulteration of meat and meat products with buffalo meat employing polymerase chain reaction assay .Food Analytical Methods 5: 296-300.

[10]. Girish P, Anjaneyulu A, Viswas K, Anand M, Rajkumar N, et al. (2004) Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. Meat Science 66: 551-556.

[11]. Kesmen Z, Sahin F, Yetim H (2007) PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. Meat science 77: 649-653.

[12]. Mane B, Mendiratta S, Tiwari A (2012) Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. Food Control 28: 246-249.

[13]. Arslan A, Ilhak OI, Calicioglu M (2006) Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. Meat Science 72: 326-330.

[14]. Chikuni K (1994) Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. Animal science and Technology 65: 571-579.

[15]. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat science 51: 143-148.

[16]. Unseld M, Beyermann B, Brandt P, Hiesel R (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. Genome Research 4: 241-243.

[17]. Jaini SY, Brahmbhatt MN, Rank DN, Joshi CG, Solanki JV (2007) Use of cytochrome b gene variability in detecting meat species by multiplex PCR assay. Indian Journal of Animal Sciences 77(9): 880-881.

[1] Multiplex PCR