المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٦، عدد إضافي ٣، ٢٠١٢ (١٩٣-١٩٦)
وقائع المؤتمر العلمي السادس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للنوع المتخصص المعتمدة على جين السايتوكروم ب للتحقق من لحوم الأبقار

إسراء أحمد يونس و رعد عبد الغني السنجري

فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة على لحوم الأبقار المستوردة (الهندي و البرازيلي و الاسترالي) وعينات من اللحوم المفرومة العائدة للأبقار (الشرابي، الجنوبي، الفريزيان) والتي تم جمعها من الأسواق المحلية للتحقق من كونها لحوم أبقار وتمييزها عن اللحوم الأخرى لحماية المستهلك اقتصاديا من خلال استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للنوع المتخصص والاعتماد على جين السايتوكروم ب. أظهرت الدراسة أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل كانت حساسة جدا وامتازت بالخصوصية العالية في معرفة عائدية عينات اللحوم المفحوصة وتحديد أصلها، كما أن البادئ المصمم على جين السايتوكروم والخاص بالأبقار اثبت وبشكل عملي انه يعمل على أنواع وسلالات مختلفة من الأبقار المحلية والمستوردة من خلال إعطاء نفس الحزمة ذات الوزن الجزيئي ٣٦٥ زوج قاعدي.كما أظهرت نتائج عينات اللحم المفروم المأخوذة من الأسواق المحلية أن نموذج واحد فقط كان يحتوي على لحوم الأبقار فقط دون غش مع لحوم أنواع أخرى، على العكس من ذلك كان هناك نموذج واحد لم يحتوي على لحم الأبقار واحتوت العينة المفرومة على لحم الجاموس والماعز أما بقية النماذج كانت عبارة عن لحم أبقار مفروم مخلوط مع واحدة أو اثنين من أنواع اللحوم الأخرى التابعة لكل من الجاموس والماعز والأغنام.

Application of species-specific polymerase chain reaction technique depending on cytochrome b gene for beef authentication

E.A. Younis and R.A. Al-Sanjary

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

The study was conducted on imported beef meat (Indian, Brazilian and Australian), and spacement of minced beef meat (Al-jnobi, Al-sharabi) and Al-frezian collected from local grocery stores for beef authentication to differentiate them from others meats in order to protect consumer economically through applying Species-specific Polymerase Chain Reaction technique using n *cytochrome b* gene. Results of this study indicated that Species-specific PCR technique was very sensitive and highly specific for the identification of the meat type, also it was found that the designed primer on mitochondrial cyt b gene of beef proved practically proved to be applied on local and imported types of meat of different breeds, since gives the same molecular weight 365 bp in all the same bands. From five minced beef samples, one sample was pure beef, other one contained no beef at all, while the remaining three samples were mixed meat of beef, buffalo, goat and mutton.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

تواجه معظم بلدان العالم سواء الدول النامية أو الدول المتقدمة ظاهرة الغش في اللحوم الحمراء وخصوصاً اللحوم المفرومة حيث تنتشر في المناطق والدول التي تعاني من ضعف الرقابة الأمنية والاقتصادية (١) فقد قدرت في فلوريدا نسبة الغش في اللحوم الطازجة ١٥,٩% (٢)، وعادة ما يكون الغش باللحوم ذات الكلفة العالية باللحوم الأخرى الرخيصة الكلفة بسبب ارتفاع ثمن اللحوم المحلية لهذا يتم خلطها مع أنواع اللحوم المستوردة (٤،٣)، ففي فنلندا مثلا تغش لحوم الأبقار بأنواع من اللحوم

الأرخص ثمنا مثل لحوم الخنازير وكذلك في انكلترا وأمريكا تغش لحوم الأبقار بواسطة لحوم الأفراس والخيول وتخلط معها عند إنتاج اللحوم المفرومة (٥). إن غش اللحوم لم يعد غشاً اقتصاديا فقط، وإنما يتعارض مع الكثير من الشرائع والديانات التي تحرم نوعاً معينا من اللحوم مثل الديانة الإسلامية والديانة اليهودية، بالإضافة إلى فقدان ثقة المستهلك بمصانع اللحوم ومنتجات اللحوم التي تحتوي على نوع من اللحوم الغير مرغوب بها أو الغير معروفة أيضاً ومن ناحية أخرى قد يرفض هذا المنتج بسبب خطورته على الصحة العامة للناس (٦) بالإضافة إلى حساسية الكثير من الأشخاص ضد أصناف معينة من اللحوم، حيث شخصت إحدى الدراسات وجود ١١ حالة حساسية ضد لحم البقر من أصل ٣٣٥طفل (٧)، وفي دراسة أخرى وجد أن نسبة الحساسية ضد لحم البقر تجاوزت ٠,٣% من عينات الناس المشمولة في الدراسة (٨)، إضافة إلى اهتمام المستهلك اليوم بمعرفة هوية المنتج الغذائي وخلوه من الأمراض الخطيرة والمشتركة التي تنتقل عن طريق هذه الأغذية مثل مرض جنون البقر وغيرها من الأمراض التي تصيب الحيوانات وبالتالي انتقال مسبباتها عن طريق اللحوم إلى المستهلك (٩). وقد يواجه أولوا الخبرة الإداريين والسيطرة النوعية بشكل رسمي في اغلب الحالات صعوبة في تمييز اللحوم وذلك لوجود طرق وتقنيات ليست كافية لتمييز اللحوم بسبب امتلاكها مساوئ كثيرة، لكن التطور السريع للتقنيات الكفوءة والدقيقة المعتمدة على تشخيص وتقدير الأحماض النووية للحوم جعلها من الطرق المهمة والضرورية للكشف عن الغش في اللحوم ومنتجاتها في تصنيع المنتجات الغذائية لتكون أكثر أمناً في المجتمع وللحفاظ على صحة المستهلك (١٠).

يعتبر جين السيتوكروم ب من الجينات المهمة الواقعة في مجين الميتوكوندريا والتي يمكن الاستفادة منها في تمييز أنواع لحوم الحيوانات، حيث يتم تصميم بادئات متخصصة على هذا الجين والذي يسمح بحصول تضاعف لملايين المرات من خلال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ومن ثم تحديد نوع الكائن الحي على أساس هذا الموقع أو التتابع الخاص بذلك النوع (١١) ولأهمية موضوع الغش ارتأينا استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المتخصص المعتمدة على جين السيتوكروم ب في التعرف على لحوم الأبقار من سلالات مختلفة وكذلك اللحوم المفرومة المعروضة في الأسواق المحلية والتحقق من عائديتها للحوم الأبقار.

المواد وطرائق العمل

تم جمع عينات وبمقدار ٢٥ غم من النسيج العضلي خال من الشحوم والأنسجة الرابطة من للحوم الأبقار المستوردة (الهندي، البرازيلي، الاسترالي)، إضافة إلى عينات اللحوم المفرومة للأبقار المحلية (الشرابي، الجنوبي، الفريزيان)، وضعت العينة في كيس بلاستيكي كذلك ثبت رقم العينة ونوع الحيوان المأخوذ منه اللحم بالإضافة إلى تاريخ جمع العينات، تم ربط الكيس بشكل جيد ونقلت للمختبر تحت التبريد لحفظها في المجمدة على درجة حرارة (-٢٠) ºم لحين إجراء عملية استخلاص الـ DNA. تم تقطيع عينات اللحوم إلى قطع صغيرة جداً بواسطة مشرط معقم على قطعة من الزجاج نظيفة ومعقمة ثم مزجت بشكل جيد ليتم اخذ جزء منها بحدود ١-٢ غم لاستخلاص الـDNA منه اعتماداً على النشرة الداخلية لطقم الاستخلاص المجهزة من شركة Sacace الايطالية. و تم إعداد تفاعلات النوع المتخصص اعتمادا على طريقة (١٢،١٣) حيث تم استخدام المحاليل التالية: محلول منظم 10X وماء مقطر غير مؤين معقم، وقواعد نتروجينية ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين، أنزيم بلمرة الدنا،زوج من البادئات المتخصصة للأغنام والجاموس والماعز والأبقار المصممة على جين السيتوكروم ب لمجين الميتوكوندريا المجهزة من شركة Germany promega وتتابع هذه البادئات هي كما يلي:

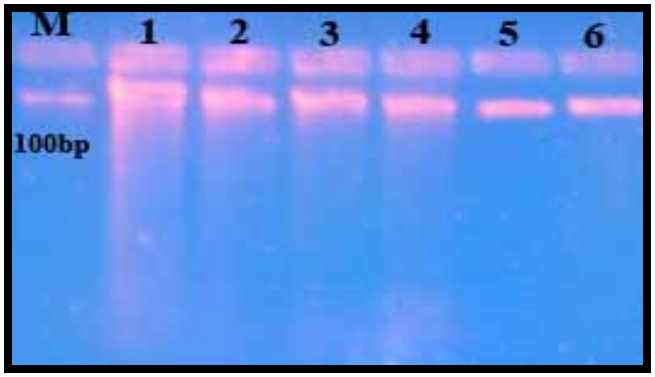
اسم البادئ Mt-cyt b	رقم البادئ F/R	تتابع البادئ 3----------5
الأغنام	الأول	ATT AGT CAA TGT ATA TTC TGA ATC TTA GG GAG GTT
	الثاني	ATT TTC GAT AGT GCT AGC TAC
الجاموس	الأول	ACA CGT AGG ACG CAT ATA C
	الثاني	CCA TTC AGG CTT GAT GTG G
الماعز	الأول	CAT ACA TAT CGG ACG AGG TC
	الثاني	GTA ATA TTA GAA CAA GAA TTA GTA GC
الأبقار	الأول	GCC AAT TGC TAT GAT GAT AAA TGG A
	الثاني	GGC TTA TAT TAC GGG TCT TAC ACT

وضعت الأنابيب الحاوية على المواد المذكورة أعلاه في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler من شركة Germany Eppendorf وتم برمجة الجهاز بالبرنامج الخاص بهذا التفاعل (٩٥ º م لمدة ٤ دقيقة خلال دورة واحدة و ٩٥ ºم لمدة دقيقة و ٥٢ º م لمدة دقيقة و ٧٢ ºم لمدة ٧ دقيقة خلال دورة واحدة) بعد انتهاء عملية التفاعل رحلت عينات الـ DNA المتضاعفة على قالب هلام الاكاروز بتركيز ٢%. نقل قالب الهلام إلى حوض بلاستيكي يحتوي على

صبغة الأثيديوم بروماید لمدة ساعة واحدة بعدها يصور الهلام باستخدام كاميرا رقمية. تم تقدير الأحجام الجزيئية لقطع الـ DNA المتضاعفة لعينات اللحم بمقارنتها مع الحزم ذات الأوزان الجزيئية المعروفة في الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder.

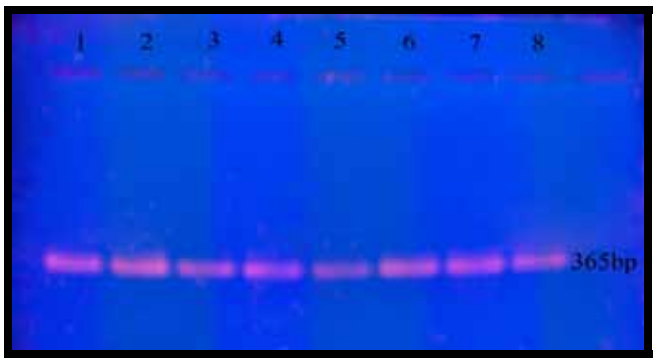
النتائج

أظهرت الدراسة أن تركيز الحمض النووي (DNA) المستخلص من عينات لحوم الأبقار المحلية والمستوردة , والذي تم قياسه بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) قد تراوح بين ٠,٣-١,٢ مايكروغرام / مايكروليتر في حين تراوحت نقاوته بين ١,٤٥-١,٨٠، وتم ترحيل كمية من DNA المستخلص لكل نوع من أنواع اللحوم لأنواع الحيوانات المختلفة على هلام الأكاروز تركيز ١% ومقارنته مع دنا لامبدا السليم (غير المقطع) بتركيز ٠,٠٢٥ مايكروغرام / مايكروليتر وذلك للتأكد من عملية الاستخلاص للـ DNA كما في الشكل (١).



الشكل (١) استخلاص DNA من عينات اللحم المتمثلة بالأرقام (١) أبقار محلي جنوبي (٢) أبقار محلي شرابي (٣) أبقار محلي فريزيان (٤) لحم أبقار برازيلي (٥) لحم أبقار هندي (٦) لحم أبقار استرالي والمرحلة على ١ % من هلام الأكاروز ويمثل (M) الدليل ألحجمي القياسي المتكون من دنا لامبدا غير المقطع بتركيز ١٠٠ نانوغرام .

كما أظهرت النتائج حزمة واحدة فقط لجميع لعينات لحوم الأبقار المحلية والمستوردة وبوزن جزيئي ٣٦٥ زوجا قاعديا والتي تم حسابها بالمقارنة مع حزم الدليل ألحجمي القياسي DNA Ladder مع هذه الحزمة عندما استخدم نفس البادئ الخاص بالأبقار لعينات لحوم الأبقار المحلية (الشرابي، الجنوبي، الفريزيان) والمستوردة (الهندي، الاسترالي، البرازيلي)، وقد استعملت للأنواع جميعها نفس الكميات و التراكيز من المواد الداخلة في تفاعل البلمرة المتسلسل لكل الأنواع ماعدا DNAالخاص بكل نوع وكما موضح في الشكل ٢.



الشكل (٢): الحزمة المميزة في عينات اللحم التابعة لأنواع مختلفة (١-٨) من اللحوم المحلية والمستوردة للحوم الأبقار ذات الوزن الجزيئي ٣٦٥ زوجا قاعديا والمرحلة على هلام الاكاروز ١,٢% باستخدام طريقة Species-specific PCR والبادئ الخاص بالأبقار.

وفيما يخص عينات اللحوم المفرومة فقد ظهر نموذج واحد فقط (النموذج الثاني) من النماذج الخمسة للحوم المفرومة محتويا على لحوم الأبقار، وكانت النماذج الأربعة المتبقية مخلوطة بلحوم حيوانات أخرى، فقد احتوى النموذج الأول على خليط من لحوم الأبقار والأغنام بينما كان النموذج الثالث حاويا على لحوم مخلوطة من لحوم الجاموس والأبقار أما النموذج الرابع فقد احتوت العينة على لحوم مخلوطة لثلاثة أنواع من اللحوم وهي الأبقار والجاموس والماعز في حين لم يحتو النموذج الخامس على لحم الأبقار حيث كانت عينة اللحم المفروم عبارة عن لحم مخلوط من لحم الجاموس والماعز (الجدول ١).

الجدول (١) حزم DNA المتضاعف في عينات اللحوم المفرومة والتي تظهر في بعض منها وجود أكثر من نوع من اللحم.

اللحوم المفرومة	اللحم المفترض	جاموس	ماعز	أبقار	أغنام
نموذج لحم رقم ١	أبقار	-	-	+	+
نموذج لحم رقم ٢	أبقار	-	-	+	-
نموذج لحم رقم ٣	أبقار	+	-	+	-
نموذج لحم رقم ٤	أبقار	+	+	+	-
نموذج لحم رقم ٥	أبقار	+	+	-	-

المناقشة

يعد التعرف على نوع اللحوم وتحديد أصل ومعرفة عائديتها مهما اقتصاديا وفي حماية المستهلك من الغش التجاري أو مشاكل الحساسية لنوع معين من اللحوم فضلاً عن تجنب الإصابة بالإمراض المشتركة التي تنتقل عن طريق اللحوم (١٤،١٥). إن تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA المستخلص من ٢ غم لحم في هذه الدراسة كانت كافية لاختبارات الغش بتقنية تفاعل البلمرة

المتسلسل، و استخدم (١٦) ٠,٥ غم من النسيج في استخلاص DNA لتمييز ومعرفة الغش في أنواع من لحوم حيوانات مختلفة.

في هذه الدراسة استخدم البادئ المتخصص للأبقار المصمم على جين السايتوكروم b لمجين الميتوكوندريا وتم تطبيقه على جميع عينات لحوم الأبقار المحلية والمستوردة وحصلنا على حزمة واحدة فقط وبوزن جزيئي ٣٦٥ زوج قاعدي حيث استخدمت للأنواع جميعها نفس الكميات و التراكيز من المواد الداخلة بتفاعل البلمرة المتسلسل عدا استخدام الحمض النووي المستخلص والخاص بكل نوع، واتفقت النتائج هذه مع ما سبق (١٦) عندما استخدم بادئ مصمم على جين السايتوكروم b لمجين الميتوكوندريا على لحوم الجاموس والأبقار لتمييزها عن بعضها البعض والحصول على حزمة بوزن جزيئي ٣٦٥ زوج قاعدي لكل منهما، وفي دراسة أخرى استخدم بادئ مصمم أيضا على جين السايتوكروم b لمجين الميتوكوندريا حصل على وزن جزيئي ٢٧٤ زوجا قاعديا للحوم الأبقار (١٧)، وهذا ما أكده (١٨) في دراسته على لحوم الأبقار وتمييزها عن بقية اللحوم الأخرى الصالحة للاستهلاك البشري عندما استخدم زوج من البادئات العامة المصممة على جين السايتوكروم b وحصل على حزمة متضاعفة ذات وزن جزيئي ٣٥٩ زوج قاعدي وهذا يفسر النتيجة التي حصلنا عليها وهي بان حجم القطعة المتضاعفة يعتمد على تصميم البادئ وارتباطه مع الـ DNA القالب وذلك بواسطة المنطقة المحصورة بين البادئ الأمامي والخلفي، حيث ذكر Dalmasoo وجماعته (١٩) إن جميع نتائج الحزم المتضاعفة تختلف في قيمة أوزانها الجزيئية وذلك حسب تصميم البادئ والذي يعتمد على نوع الجين الذي يصمم عليه البادئ.

إن فقدان ثقة المستهلك بمصانع اللحوم ومنتجاتها التي تحتوي على نوع من اللحوم غير المرغوب بها أو المجهولة من الأمور المهمة التي تواجه العاملين في مجال صناعة اللحوم لأسباب عديدة تخص المستهلك من الناحية الصحية والدينية والاقتصادية (٢٠)، ففي هذه الدراسة ومن خلال إجراء تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للنوع المتخصص على خمسة عينات من اللحوم المفرومة التي تم شراءها من الأسواق المحلية على أنها لحوم مفرومة تابعة للأبقار فقط تبين انه من النماذج الخمسة احتوى نموذج واحد على لحم الأبقار فقط دون الغش فيه، بينما كانت النماذج الأخرى حاوية على لحم الأبقار مع لحوم أخرى صالحة للاستهلاك البشري مثل لحم الجاموس والأغنام والماعز وتكمن خطورة الغش في المناطق والدول التي تعاني من ضعف الرقابة نظرا لأوضاعها غير المستقرة وهذا ينعكس سلباً على صحة المستهلكين وحقوقهم الأساسية وأكثر الحالات خطراً هي السلع المستوردة منتهية الصلاحية (١).

المصادر

١. عبد الملك، أشرف محمد. الرقابة الصحية على اللحوم ومنتجاتها. معهد بحوث صحة الحيوان – أسيوط ٢٠٠٨.

٢. Hsich HM, Chiang HL, Tsai LC, Lai SY, Huang NE, Linacre A, Lee JCI. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. Forensic Sci Int. 2001 ; 122: 7-18.

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

4. USDA- FSIS. Nutrition Labelig:Nutrient content claims on multi-scrve, meat-type meat and poultry. Poultry Products. Available Form USDA- FSIS, 2003. http:www.fssis.usda.gov/ oppde / rdad /00 - 046p. htm. posted 050304.

5. King NL, Kurth I. Analysis of raw beef samples for adulteranat meat species by enzyme- staining of isoelectric focusing gel. J Food Sci. 1984; 47: 1608-1612.

6. Sherikar AT, Khot JB, Jayarao BM, pillai SR. Use of species- specific antisera to adrenal heat - stable antigens for the identification of raw and cooked meats by agar gel diffusion and counter immunoelectrop-horetic techniques. J Sci Food Agri. 1988 ; 44: 63-73.

7. Werfel SJ, Cooke SK , Sampson H A. Clinical Reactivity to beef in children allergic to cows milk. J Allergy Clin Immunology 1997 ;3: 293-300.

8. Fiocchi A , Restani P , Riva E. Beef allergy in children nutrition. International J App Basic Nutrional Sci. 2000 ; 16: 454-457.

9. Brodmann p. Development and Validation of species identification, ph.D. Thesis. University of Basel 2002.

10. Mane BG. Identification of species origin of meat by random amplified polymorphic DNA - polymerase chain reaction (RAPD-PCR). M. V. SC. Thesis submitted to G.B.P.U.A. and T., Pantnagar , 2004.

11. Kocher TD , Thomas WK , Meyer A , Edwards SV , Paabo S , Villablanca FX , Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 ; 86: 6196-6200.

12. Bottero MT , Civera T, Anastasio A , Turi RM , Rosati S.Identification of cow 's milk in " buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. J Food Prot. 2002 ; 65(2): 362-366.

13. Meyer R, Hofelein C, Luthy J, Candrian V. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis:a sample method for species identification in food. J AOAC Int. 1995 ; 76(6): 1542-1551.

14. Abdel-Rahman SM,El-saadani MA, Ashry KM, Haggag AS.Detection of adulteration and identification of Cats ,Dogs, Donkys and Horses meat using species-specific PCR and PCR-RFLP Techniques. Aust. J. Basic Appl Sci. 2009 ; 3(3):1716-1719.

15. Ong SB, Zuraini MI, Jurin WG, Cheah YK, Tunung R, Chai C,Haryani Y, Ghazali FM , Son R. Meat molecular detection: Sensitivity of polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. ASEAN Food J. 2007 ; 14(1): 51-59.

16. Ahmed MMM , Abdel-Rahman SM , El-Hanafy AA. Application of Species - specific polymerase chain reaction (PCR) and cytocrome b gene for different meat species authentication. Biotechnol. 2007 ; 6(3): 426-430.

17. Jain S, Brahmbhait MN , Rank DN , Joshi CG, Solank JV.Use of cytochrome b gene variability in detecting meat species by multiplex PCR assay. Indian J Anim Sci. 2007 ; 77(9): 880-881.

١٨. السنجري، رعد عبد الغني. التعرف على لحوم الأبقار بواسطة تقنية تباين أطوال قطع التقييد للتفاعل التضاعفي لسلسلة ألـ دنا PCR)). المجلة العراقية للعلوم البيطرية ٢٠٠٩ ; ٢٣ (١): ٤٣-٤٦.

19. Dalmasso A , Fontanella E , Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. A multiplex PCR assay for identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes 2004 ; 18: 81-87.

20. Jha VK, Kumar AM, Okhot UV. Indirect Enzyme Linked Immuno sorbent Assay in detection and differentiation of cooked and raw pork from meats of other species. J Food Sci Technol. 2003 ; 40: 254-256.