مجلة البصرة للعلوم الزراعية 2012، 25(2): 138-151

الكشف عن غش اللحوم المستوردة لحيوانات المزرعة والخنزير بتقنيات التفاعل السلسلي للبوليمريز مع تتابعات الانواع التخصصية

طالب احمد جايد و ضرغام كامل صكر

قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

taleb1968@yahoo.com

الخلاصة. أجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية، قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة، جامعة البصرة. حللت لحوم الابقار، الجاموس، الخيول، الحمير، الاغنام و الخنازير لكشف وتحديد ظاهرة غش اللحوم في هذه الانواع الحيوانية. استخلص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (0.5 غرام) وعرض للتحليل بتقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز مع تتابعات الانواع التخصصية. تم فحص البادئات من خلال استخلاص DNA من لحوم حيوانات الدراسة وتم التأكد من عمل البادئات. أظهرت النتائج إن أستخلاص DNA من مستودع جينات (Genome) و DNA مايتوكندريا لكافة أنواع الحيوانات المشمولة بالدراسة كان ذو نوعية جيدة جدا وذو وزن جزيئي عالي والذي يعتبر من أهم المتطلبات الاساسية في البحوث الجزيئية وخصوصا الجانب الوراثي. تم الكشف عن منتج التضخيم للجين المشفر لتتابعات الانواع التخصصية في لحم الأبقار والجاموس، إذ أعطى نفس الحزمة في الابقار والجاموس والتي ظهرت بحجم 603 زوج قاعدي في عينات اللحوم الخام والمعلبة والمجمدة والمفرومة. كما تم الكشف عن منتج التضخيم من الجين المشفر لتتابعات الانواع التخصصية للخيول والحمير، إذ أعطت نفس الحزمة في الخيول والحمير والتي ظهرت بحجم 221 زوج قاعدي في كلا النوعين في عينات اللحوم الخام فقط. فيما يتعلق بلحوم الاغنام فقد تم الكشف عن منتج التضخيم من الجين المشفر لتتابعات الانواع التخصصية للأغنام، إذ أعطى منتج التضخيم الحزمة التي ظهرت بحجم 374 زوج قاعدي في عينات اللحوم النيئة واللحم المفروم والتي نجحت بالتمييز المباشر في عينات اللحوم المستخدمة في هذه الدراسة. اعطى منتج التضخيم من الجين المشفر لتتابعات النوع التخصصي للخنازير الحزمة الخاصة بالخنزير والتي ظهرت بحجم 100≤ زوج قاعدي في عينات اللحوم الخام. أظهرت هذه النتائج أن تقنيات الوراثة الجزيئية مثل التفاعل السلسلي للبوليمريز و تتابعات الانواع التخصصية هي طرق موثوق بها وأرخص بكثير وأسرع لتحديد اللحوم في المختبرات ومراقبة الأغذية والكشف عن نوع اللحوم في منتجات اللحوم للمصادقة على اللحوم الحلال.

الكلمات المفتاحية: تتابعات الانواع التخصصية، التفاعل السلسلي للبوليمريز، لحوم حيوانات المزرعة، الخنزير، غش اللحوم.

المقدمة

استخدمت عدة تقنيات للكشف عن غش اللحوم ومن هذه التقنيات: تقنيات الاختبارات الفيزيائية المعتمدة على المظهر العام للحم من خلال اللون، الملمس والرائحة وعند وجود أجزاء أخرى من جسم الحيوان مع اللحوم ويعطي هذا الاختبار فكرة أولية عن أنواع اللحوم من خلال خصائص اللحم والدهن (12، 26، 27، 28، 29)، إذ يمكن التمييز بين لحوم الابقار والجاموس القريبة من بعضها البعض من خلال الخصائص الفيزيائية مثل اللون، نسجة اللحم، المرمرية، لون الدهن، نسجة الدهن وموقعه (26، 28).

التقنيات النسيجية: في هذه التقنية يتم قياس طول العضلة بشكل عام، القطر، الكثافة ونمط الالياف

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني

العضلية في اللحوم ذات الاصل الحيواني. ويمكن تحديد حالة الخلط غير القانونية التي تحصل بين لحوم الابقار والجاموس أثناء عملية الذبح بوساطة التقنيات النسيجية، إذ تم مقارنة بعض الاختلافات الاساسية في هذه الانواع من اللحوم ومن هذه الخصائص قطر الالياف حيث يكون في الابقار أكبر من الجاموس وعدد الالياف العضلية في المليمتر المكعب في الابقار أقل من الجاموس أما تخطيط العضلة يكون أقل في الابقار مقارنة بالجاموس (28). التقنيات الكيميائية: تعتبر الاختبارات الكيميائية المختلفة ذات قيمة كبيرة بالنسبة لأنواع اللحوم، إذ يمكننا في هذه الاختبارات بسهولة تقدير كمية بعض المواد الكيميائية الموجودة في لحوم الحيوانات المختلفة (31)، وبالتالي معرفة نوعية اللحوم على أساس المكونات الموجودة في اللحم، حيث يعطي الكاروتين الموجود في لحوم الابقار والجاموس مواصفات نوع اللحم في حالة الحاجة لمنع ذبح البقرة في الهند. وهناك قيم مختلفة من المركبات التي توجد عادة في مختلف انواع اللحوم الحيوانية إذ تم وصفها من قبل وLawrie و ledward (16) و Singh (26).

التقنيات الجزيئية المعتمدة على الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين: يعتبر الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين الجزء المفضل لتوصيف الانواع الحيوانية بسبب استقراره بالحرارة والمعالجة. واهم تقنية في هذا المجال هي تقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز (Polymerase Chain Reaction –PCR)، إذ يمكن الحصول على نسخ متعددة من قطعة معينة من تسلسل الحامض النووي في المختبر ولها درجة عالية من الانتقائية والحساسية. يعد تضخيم PCR لتسلسل الحامض النووي دليلاً واضحاً على قدرتها على اكتشاف حتى نسخة مفردة من عينة خلية واحدة. ويمكن بوساطة هذه التقنية تحديد أنواع اللحوم ذات صلة القرابة الوثيقة مع التمييز بين اللحوم الخام للذكور والاناث (23). ويمكن تحديد الانواع الحيوانية من منتجات اللحوم والأغذية المعدلة وراثيا. ومن بين التقنيات الجزيئية هي تقنية تتابعات الانواع التخصصية لتقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز (Species Specific Repeat – Polymerase Chain Reaction). وهذه التقنية هي واحدة من طرق الوراثة الجزيئية تسمح بتحديد أنواع اللحوم المختلفة سواء في اللحوم النيئة أو اللحوم التي تتعرض لمعاملة حرارية (28). ويجب في هذه التقنية معرفة تسلسل النيوكليوتيدات من الجينات التي على أساسها سوف يتم تحديد الانواع من خلال تصميم هذه االبادئات. إن بادئات الانواع التخصصية مفيدة جداً للتحليل الروتيني لتحديد الانواع الحيوانية، ويجري بسرعة عالية، إذ ضخمت بادئات الانواع التخصصية قطعة واحدة فقط من الانواع المستهدفة ويمكن الكشف بحساسية عالية في مجموعة من التتابعات من المصادر المختلفة (13). مع هذه الاعتبارات لتقنية PCR فأنه من المهم وضع الجينات التي تظهر الاختلاف في الانواع قيد الدراسة (2، 6، 17)، إذ تقع جينات السايتوكروم ب (Cytochrome b genes – Cyt. b) على المستودع الجيني (DNA) للمايتوكندريا والتي تستخدم في كثير من الاحيان في الدراسات المتعلقة بتحديد أنواع اللحوم وكذلك تسلسل البيانات للعديد من انواع الحيوانات الفقرية واللافقرية (7).

تعتبر مسألة غش اللحوم وخاصة المعلبة من الأمور المهمة جدا في الوقت الحاضر بسبب كون معظم اللحوم المستوردة تأتي معلبة ومخلوطة على شكل شرائح او مفرومة وبالتالي من السهل خلط أنواع مختلفة من لحوم الأنواع الحيوانية وبالنتيجة فأن إمكانية الكشف عنها صعبة جدا إن لم تكن مستحيلة. أن تحديد أصل ومعرفة عائدية اللحوم أصبح من الامور المهمة ومن التحديات التي تواجه العاملين في مجال فحص وصحة وسلامة اللحوم (30). وواحدة من هذه التحديات هي أساليب الغش

ووضع العلامات الخاطئة على مصنعات اللحوم ومنتجاتها، إذ تعتبر هذه الاساليب مرفوضة من قبل أنظمة وقوانين الدول بشكل عام وكذلك من قبل المستهلك بشكل خاص لأسباب أقتصادية أو دينية أو صحية (5). كما أن انواع اللحوم الباهظة الثمن في الاسواق مثل لحوم الابقار تكون هدفا للغش أو الاستبدال بأنواع أرخص منها ثمنا وهذه من المشاكل الكبيرة التي تواجهها بعض الدول وخصوصا في تصنيع اللحوم المفرومة.

كانت هناك محاولات جادة في كثير من الدول للسيطرة على هذه المشاكل من خلال إجراء فحوصات كيميائية حيوية أو إنزيمية، اذ يمكن تحديد منشأ أنواع اللحوم باستخدام أساليب عديدة مثل الاختبارات المناعية، التحليل الحسي، الاختلافات التشريحية، التمايز النسيجي في الشعر الذي قد يكون موجود ربما في اللحوم، خصائص الأنسجة الدهنية، مستوى الكلايكوجين في الأنسجة العضلية، الترحيل الكهربائي وتهجين الحامض النووي (4، 9). كان استخدام معظم هذه الطرق محدودا بسبب مشكلات في النوعية، التعقيد، والتكلفة العالية وبعض المتطلبات الأساسية للبيانات حول الاختلافات في مكونات البروتين وكذلك بسبب التقارب الجيني بين الكائنات المفحوصة وبالتالي فأن التعبير الجيني لجينات هذه الأنواع متقارب أو متشابه لذا كل هذه الطرق لم تكن واقعية وأخيرا توصل الباحثون إلى طرق وراثية جزيئية من خلالها يتم البحث عن مقارنات بين الاليلات وأسباب التشابه والاختلاف بين جينات الحيوانات بعد اخذ جينات قياسية من هذه الحيوانات المشكوك في خلط لحومها مع لحوم الحيوانات الاخرى. فكانت هناك حاجة لتطوير طريقة أكثر دقة، سريعة وسهلة الاستخدام مقارنة بالطرق القائمة المذكورة أعلاه. وقد سهلت التطورات في مجال علم الوراثة الجزيئية وتحديد أنواع النباتات والبكتيريا والحيوانات بدقة عالية. ومن هذه التقنيات هي تقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز (Polymerase Chain Reaction–PCR) وتقطيع أطوال القطع لتشكلات الحامض النووي (Restriction fragment Length Polymorphism –RFLP) والتضخيم العشوائي لتشكلات الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين (Random amplified polymorphic DNA–RAPD) (8، 20). ولأهمية موضوع الغش من الناحية الاقتصادية، الصحية والدينية قمنا بهذه الدراسة للكشف عن عائدية اللحوم وتحديد الغش باستخدام تقنيات التفاعل السلسلي للبوليمريز والتي تعد من أحدث التقنيات في محال الوراثة الجزيئية ومنها تقنية SSR–PCR للتعريف بلحوم الابقار، الجاموس، الخيول، الحمير، الاغنام والخنازير باستخدام تتابعات الأنواع التخصصية.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية في قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، إذ جمعت عينات اللحوم الطازجة من الابقار، الجاموس و الاغنام من الحقل الحيواني وسوق العشار في البصرة بينما جمعت اللحوم المعلبة بشكل عشوائي من مناطق مختلفة من محافظة البصرة، أما عينات الحمير فقد جمعت من مختبر الجراحة في كلية الطب البيطري، جامعة البصرة واستورد لحم الخيول من المانيا لتعذر الحصول عليه من العراق كما جلب لحم الخنزير من جزيرة ام الرصاص العراقية. وكان مجموع العينات المستخدمة في التجربة 20. وضعت عينات اللحم في حافظات صغيرة ومحكمة الغلق وتم تعليم العينات عن طريق وضع أحرف وأرقام عليها وحفظت بدرجة حرارة 4 م

وهيئت من أجل إستخلاص الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (DNA).

استخلص DNA من عينات اللحم بالطريقة الملحية وجمعت كميات من اللحم حسب الطريقة التي وصفها Baradakci و Skibinski (10) مع أجراء بعض التحويرات عليها. تم قياس نوعية ونقاوة DNA بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاغاروز (2 %) في TBE 1X محلول منظم والذي يحتوي على صبغة بروميد الايثيديوم 1 % (25). شحنت الحفر في الهلام بوساطة 6 مايكروليتر من خليط DNA المحضر من 2 مايكروليتر من محلول التحميل (6X) و 4 مايكروليتر من DNA وتم تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي على 80 فولت لمدة 45 دقيقة على درجة حرارة الغرفة ثم فحص DNA تحت أشعة UV بواسطة جهاز توثيق الهلامات (Transilluminator Gel documentation Syn Gene).

تم قياس كمية DNA لكل عينة بوساطة تقنية الامتصاص الضوئي بجهاز Nanodrop المجهز من شركة Thermo Scientific الأمريكية. لمعرفة حجم الجينوم الكامل (كمية DNA في نانوغرام/مايكروليتر). أعتمد في النتائج على الكثافة البصرية (Optical density–OD) 260 و280 نانو مول وأستخدم محلول TE للمعايرة. أعتمدت نقاوة DNA على أساس استخدام الكثافة البصرية بنسبة 260–280 نانو مول. وتكون العينات بالنقاوة المطلوبة لتقنية PCR تقريبا 1,5–2 مايكروليتر.

التفاعل السلسلي للبوليمريز لتقنية تتابعات الانواع التخصصية

تم استعمال مجموعة معينة من البادئات تم اختيارها لكل نوع من الحيوانات المشمولة بالدراسة والتي تضخم قطعة محددة من جين ذلك النوع الحيواني كما في الجدول (1). تم إذابة البادئات بالماء المقطر المعقم بحيث حصلنا على التركيز المطلوب (1 نانو غرام/مايكروليتر) وبعد ذلك تم تخفيفه بالماء المقطر المعقم بحيث أصبح التركيز النهائي 10 بيكو مول/مايكروليتر. تم تحضير المواد الخاصة بتقنية PCR ووضعت العينات في الثلج وتم العمل في مكان معقم ونظيف في كابينة خاصة بال PCR (PCR Cabinate) والتي تحتوي على أشعة UV لتعقيم الماصات والانابيب والتبات وتم العمل بإرتداء القفازات الطبية المعقمة، إذ تم تحضير الخليط بتقنية PCR في انابيب أبندروف سعة 100 مايكروليتر بحيث أصبح التركيز النهائي للمكونات 25 مايكروليتر ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي الصغير (Spin) لمدة 30 ثانية (جدول 2). ووضعت الانابيب بعد ذلك في جهاز المبلمر الحراري (Thermo cycler) وتم برمجة الجهاز حسب البرنامج الخاص بكل نوع من أنواع البادئات التخصصية وذكر درجة الحرارة الخاصة بكل بادئ (1، 2، 5، 6، 17) مع اجراء بعض التحويرات عليها كما في الجدولين (3 و 4). بعد انتهاء عملية التفاعل تم أطفاء الجهاز وأخراج العينات من الجهاز وحفظها على درجة حرارة – 4 م، لحين أستخدامها في الخطوة اللاحقة (الترحيل الكهربائي). تم تحضير هلام الاغاروز بتركيز 3 % لترحيل منتج التضخيم (PCR product)، حيث تم تحضير الحوض الخاص بالترحيل ذو الابعاد 10*10 سم.

جدول (1): يوضح تتابعات البادئات المستخدمة في تقنية تتابعات الانواع التخصصية مع درجة حرارة الاستطالة الخاصة بكل بادئ.

الانواع الحيوانية	تتابعات البادئات من ´5 الى ´3	حجم منتج التضخيم/زوج قاعدي	درجة حرارة الاستطالة (م)
الابقار والجاموس	GGA GCG TGG CCC AAT GCA ATT GAA TCC ACT GCATTC AATC	603	60
الخيول و الحمير	TTCTGCTCTGGGTGTGCTACTT CTACTTCAGCCAGATCAGGC	221	55
الاغنام	AAG CTT GTG ACA GAT AGA ACG ATCAAGCTGTCTAGAATTCAGGGA	374	62
الخنزير	GGA GCG TGG CCC AAT GCA ATT GAA TCC ACT GCA TTC AAT C	≤100	57

وربطت الربلات على طرفي الحوض ووضع المشط في أحد أطراف الحوض بعد الغسل بالماء المقطر لغرض التخلص من الشوائب وبعد ذلك تم تحضير الهلام عن طريق وزن 0,75 غم من مادة الاكاروز وأذابتها في 25 مل من محلول 1X TBE في بيكر صغير ووضعت في فرن مايكروويف حيث تم تسخينها لمدة 5 دقائق بحيث يصبح لون الهلام رائق وبعد أخراجه من الفرن تم أضافة 1 مايكروليتر من صبغة بروميد الايثيديوم ورجها جيداً لغرض التجانس.

جدول (2): يوضح كمية وتركيز المكونات المختلفة التي إستخدمت في جهاز المبلمر الحراري الخاص ببادئات الأنواع التخصصية.

ت	المكونات	الكمية (مايكروليتر)
1	ماستر مكس	12,5
2	البادئ ذو الاتجاه الامامي	1
3	البادئ ذو الاتجاه العكسي	1
4	قالب DNA (30 نانوغرام/ مايكروليتر)	5
5	ماء مقطر معقم	5,5
	الحجم النهائي	25

جدول (3): يوضح نظام المبلمر الحراري لبادئات الانواع التخصصية للابقار، الجاموس، الاغنام و الخنازير.

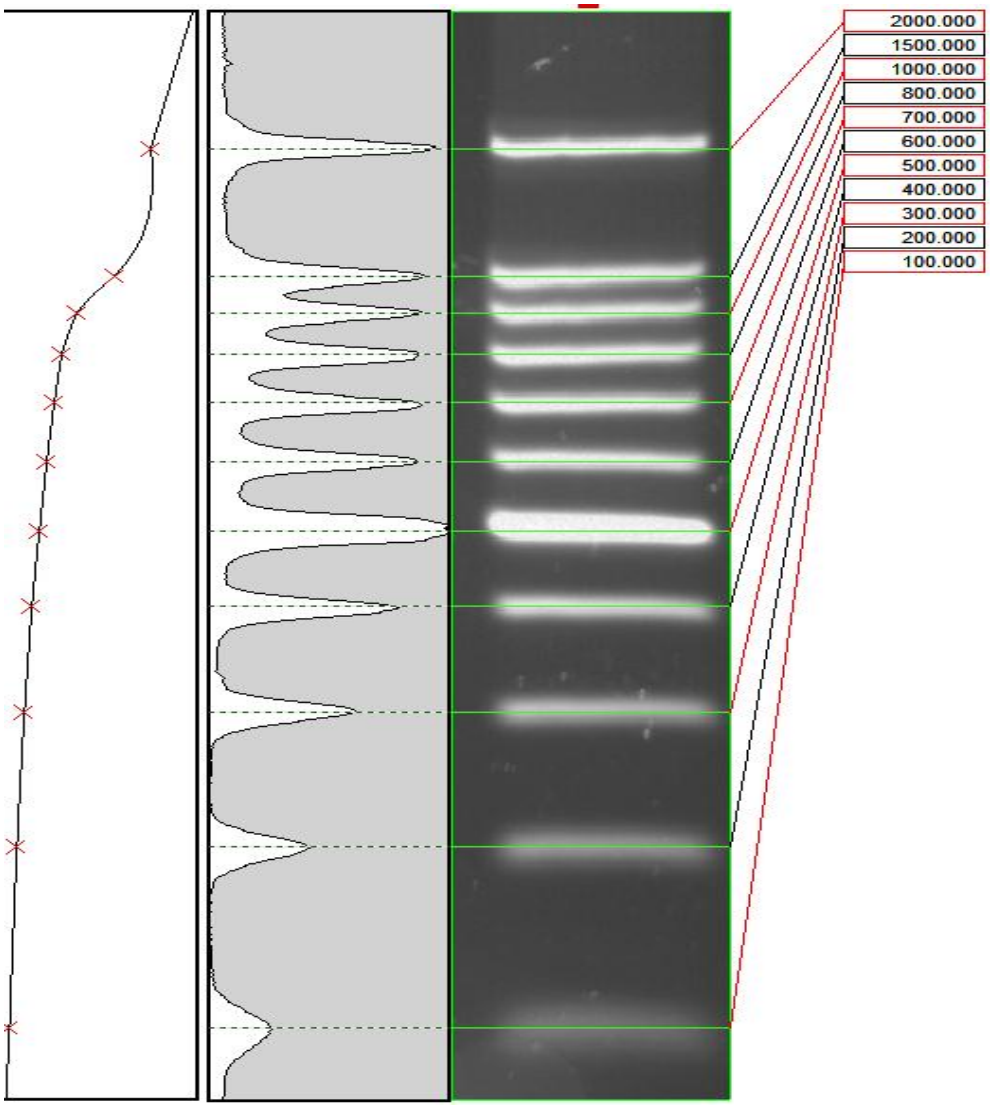
المرحلة	حالات الدنترة	درجة الحرارة/ مئوي	الزمن	عدد الدورات
1	الدنترة الاولية	94	5 دقيقة	1
2	الدنترة	94	30 ثانية	35
	التلدين	*57، 60 و 62	1 دقيقة	
	الاستطالة	72	30 ثانية	
3	الاستطالة النهائية	72	10 دقيقة	1

*: 57 (الخنازير)، 60 (الابقار والجاموس) و 62 (الاغنام)

جدول (4): يوضح نظام المبلمر الحراري لبادئ النوع التخصصي الخاص بالخيول والحمير.

المرحلة	حالات الدنترة	درجة الحرارة/ مئوي
1	الدنترة الاولية	94
2	الدنترة	94
	التلدين	52
	الاستطالة	72
3	الاستطالة النهائية	72

بعد ذلك صب الهلام في حوض الترحيل الكهربائي وبعناية تامة حتى لا تتكون فقاعات في الهلام ويترك الهلام لحين التبلمر. استخدم مؤشر الحجم الجزيئي (Ladder) المستورد من شركة Promega والذي يؤدي الى تكوين 11 قطعة معروفة الحجم الجزيئي وكما في الشكل رقم (1).

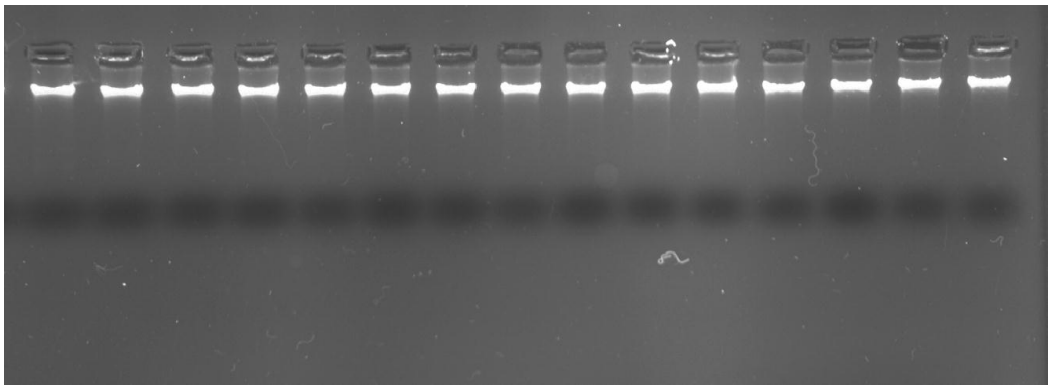


شكل (1): يوضح مؤشر الحجم الجزيئي (Ladder) والذي يكون حجمه 100 bp.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج إن أستخلاص DNA من مستودع جينات (Genome) و DNA مايتوكندريا كافة أنواع الحيوانات المشمولة بالدراسة كان ذو نوعية جيدة جدا وذو وزن جزيئي عالي والذي يعتبر من أهم المتطلبات الاساسية في البحوث الجزيئية وخصوصا في الجانب الوراثي. تم استخلاص DNA من نسيج اللحم لعينات اللحوم المستخدمة في الدراسة، إذ أستخدم 0.5 غم من نسيج اللحم لكل عينة وإستخلص بالطريقة الملحية. أما Pavel و Eva (21) فقد أستخدم 2 غم من نسيج اللحم في دراسته لتحديد DNA والتأكد من مكونات المادة الغذائية. في دراسة أخرى فقد ذكر Fairbrother وجماعته (11) و Hopwood وجماعته (14) في دراستهم على جين الاكتين المرتبط ب PCR لتحديد لحوم الدجاج في اللحوم الخليطة، إن استخدام 50 ملغم من نسيج اللحم كافية للحصول على DNA يكفي لتضخيم منتج PCR والحصول على نتائج واضحة. أما Ahmed (5) فقد استخدم 0,5 غم من نسيج اللحم في دراسته لتحديد لحوم الابقار والأغنام عن طريق استخدام تقنية SSR.

أما طريقة الاستخلاص بالكت فقد كانت كمية نسيج اللحم المستخدمة في هذه الدراسة 0,2 غم لكل عينة وقد حصلنا على نتائج جيدة، أما Abdulmawjood و Buelte (3) في دراستهم على تحديد أنواع لحوم القواقع فقد استخدم 0,3 غم من نسيج اللحم وقد حصل على نتائج جيدة أيضاً. اختيرت عينات DNA المستعملة في الدراسة بالاعتماد على الطول الموجي 260–280 والتي كان تركيزها 1.7– 2 نانو غرام. أما Ibrahim (15) فقد استخدم في دراسته العينات التي كان تركيزها يتراوح من 1000–1500 نانو غرام وأما التركيز الذي استخدمه في تفاعل PCR فقد كان 200 نانوغرام وللتأكد من دقة النتائج تم أجراء تقنية الترحيل الكهربائي لعينات DNA على هلام الأكاروز بتركيز 0.8 % كما في الشكل (2).



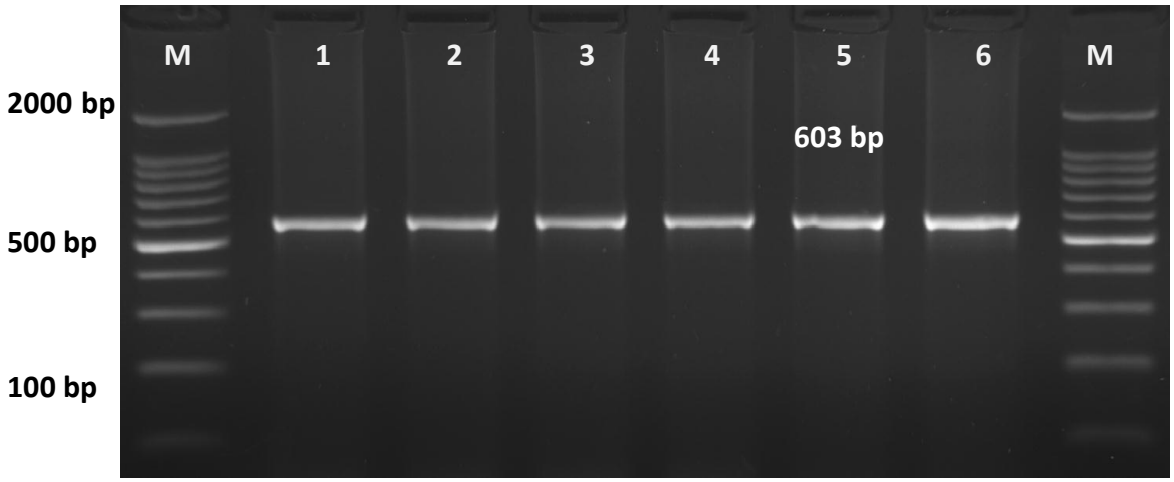
شكل (2): يمثل حجم الجينوم الكامل لعينات اللحوم المستخدمة في الدراسة والتي رحلت على هلام الاكاروز.

الابقار والجاموس

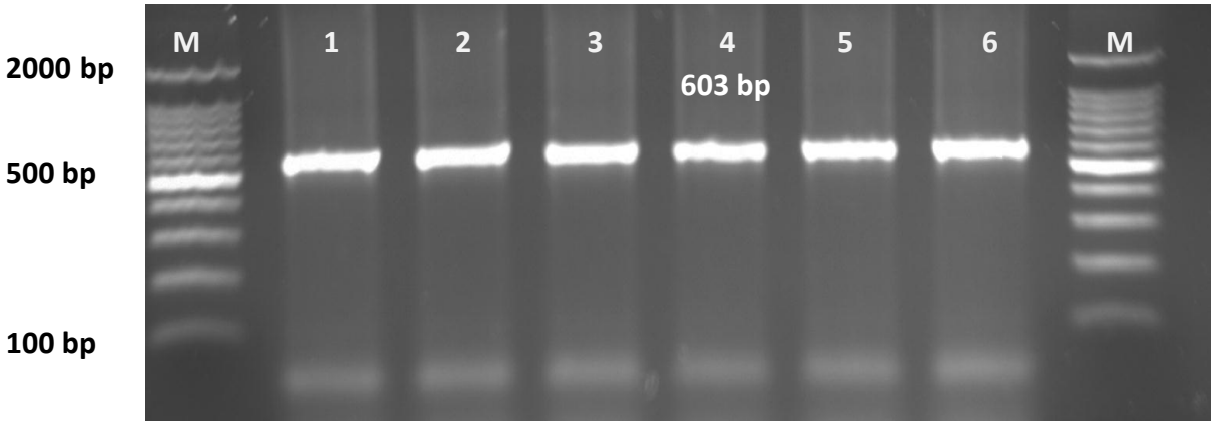
بعد الاختبارات المتكررة ضخمت قطعة DNA قطعة مفردة بحجم 603 زوج قاعدي من DNA الابقار والجاموس بدون أي عبور تفاعلي او إنتاج حزم أخرى مع انواع اللحوم الاخرى المستخدمة في هذه الدراسة والتي نجحت بالكشف المباشر عن لحوم الابقار والجاموس في عينات اللحوم الخام، المعلبة، المجمدة والمفرومة (الشكل 3 و 4). جاءت نتائجنا مطابقة تماما للنتائج التي حصل عليها Lenstre (17)، إذ حصل على الحزمة 603 زوج قاعدي في

الأبقار في حين لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع Mane وجماعته (18) بسبب استعمالهم بادئ متخصص آخر ضخم قطعة حجمها 513 زوج قاعدي وبالنتيجة النهائية فان معظم الباحثين قد استعملوا البادئ التخصصي الذي ضخم القطعة 603 زوج قاعدي لكلا النوعين.

كما هو معروف ان هناك تقارب وراثي كبير بين الجاموس والأبقار، إذ ينتميان الى عائلة واحدة (العائلة البقرية) وبالتالي ممكن اعتماد هذه الحقيقة في الجانب الوراثي، تكللت جهود الباحثين في البحث عن بادئات متخصصة للعائلة البقرية وذلك لاختصار الوقت في ظهور النتائج (22)، وأيضا كانت محاولتنا ناجحة في هذا المجال، إذ تم الكشف عن لحوم كلا النوعين في تجربة واحدة وهذا يعتبر كسب للوقت.



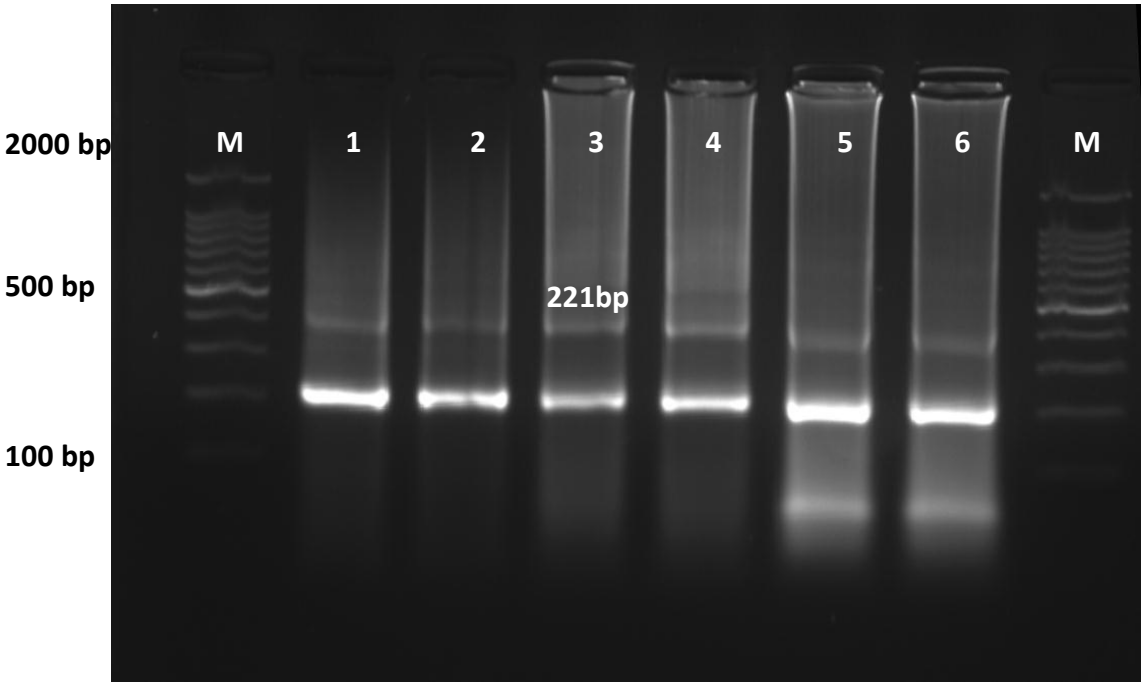
شكل (3): يوضح منتج التضخيم باستخدام بادئات الانواع التخصصية للحوم الابقار: 1- لحوم خام (عينة سيطرة)، 2- لحم الكفيل، 3- لحم المراد، 4- لحم الخيرات، 5- لحم الانوار، 6- لحم الفاخر، M تمثل مؤشر الوزن الجزيئي ذو الحجم 100 زوج قاعدي.



شكل (4): يوضح منتج التضخيم باستخدام بادئات الانواع التخصصية للحوم الابقار والجاموس: 1- لحوم جاموس خام، 2- لحم هندي، 3- لحم نيسان، 4- لحم جيكور، 5- لحم كورند بيف، 6- لحم هنا، M تمثل موشر الوزن الجزيئي ذو الحجم 100 زوج قاعدي.

الخيول والحمير

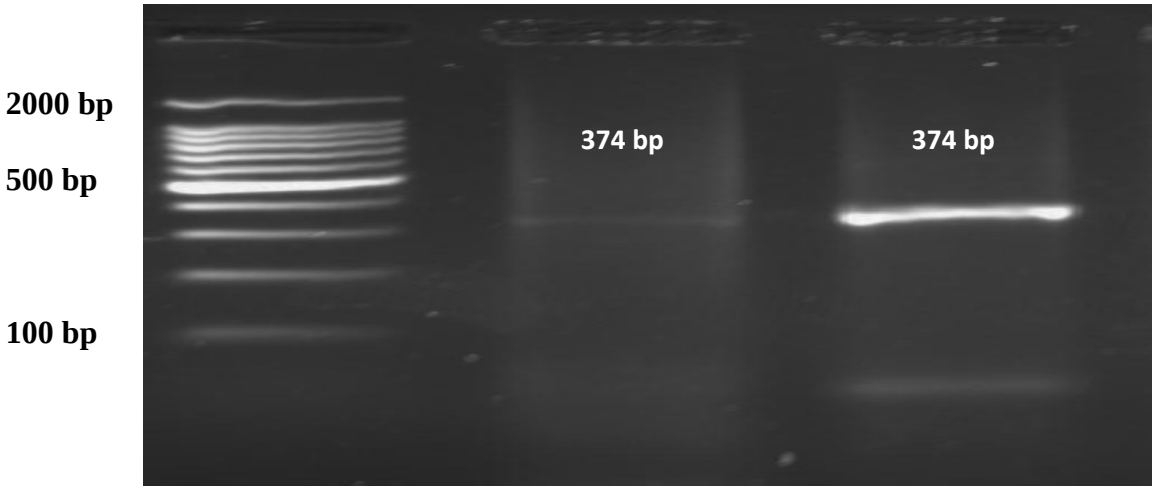
بينت النتائج إن منتج التضخيم من الجين المشفر لتتابعات الانواع التخصصية للخيول والحمير أعطت نفس الحزمة ذات الحجم 221 زوج قاعدي في كلا النوعين. وقد نجحت بالكشف المحدد من عينات اللحوم الخام من كلا النوعين (الشكل 5). والنتائج التي تم الحصول عليها كانت مطابقة للنتائج التي حصل عليها Ahmed وجماعته (7) و Lenster وجماعته (17). وكما هو معروف إن الخيول والحمير ينتميان الى فصيلة واحدة (الفصيلة الخيلية). أما في دراسة من قبل Matsunaga وجماعته (19) باستخدام تقنية PCR في تحديد أنواع لحوم الحيوانات في اللحوم ومنتجات اللحوم فقد حصل على الحزمة 439 زوج قاعدي في الخيول.



الشكل (5): يبين منتج التضخيم باستخدام بادئات الانواع التخصصية للحوم الخيول والحمير: 1-3 الحمير، 4-6 الخيول، M تمثل مؤشر الوزن الجزيئي ذو الحجم 100 زوج قاعدي.

الاغنام

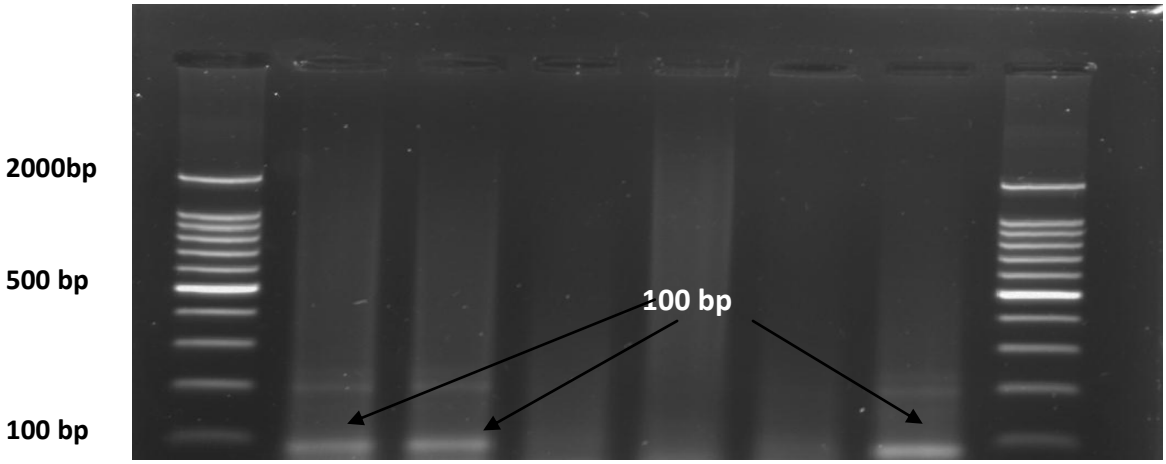
يوضح الشكل رقم (6) منتج التضخيم من الجين المشفر لتتابعات الانواع التخصصية للاغنام والتي نجحت بالتمييز المباشر من لحوم الاغنام النيئة والمفرومة، أذ أعطى منتج التضخيم الحزمة ذات الحجم 374 زوج قاعدي في عينات اللحوم الخام واللحوم المفرومة. وكانت نتائجنا موافقة للنتائج التي حصل عليها (17).



شكل (6): يوضح منتج التضخيم باستخدام بادئات الانواع التخصصية للحوم الاغنام: 1- لحم رويال، 2- لحم الاغنام الخام.

الخنازير

أوضحت نتائج تقنية بادئات الانواع التخصصية لتضخيم قطعة DNA للحوم الخنازير، ان حجم القطعة المضخمة 100≤ زوج قاعدي تعني وجود لحم الخنزير، إذ أعطى حزمة واحدة واضحة بحجم 100≤ زوج قاعدي والتي نجحت بالكشف المحدد عن عينات لحوم الخنزير الخام (الشكل 7). وأكدت النتائج التي تم الحصول عليها إنها كانت مطابقة للنتائج التي حصل عليها مجموعة من الباحثين (7، 17، 18). وهذا دليل على كفاءة البادئات والتقنية المستخدمة في الكشف التخصصي عن لحم الخنزير.



الشكل (7): منتج التضخيم للانواع التخصصية الخاص بلحوم الخنازير، إذ تمثل العينات رقم 1، 2، 6 لحوم خنازير خام.

المصادر

1. Abdel-Rahman, S.M.A. (2006). Evidences reveal that cattle and buffalo evolutionary derived from the same ancestor based on cytogenetic and molecular markers. Biotechnol. Anim. Husbandry. 22: 1-10.

2. Abdel-Rahman, S.M.A. and Ahmed, M.M.M. (2007). Rapid and sensitive identification of buffalo´s, cattle´s and sheep´s milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. Food Control. 18: 1246-1249.

3. Abdulmawjood, A. and Buelte, M. (2001). Snail species identification by RFLP-PCR and designing of species-specific oligonucleotide primers. J. Food Sci., 66: 1287-1293.

4. Abdulmawjood, A.; Schnenbrucher, H. and Bulte, M. (2003). Development of polymerase chain reaction system for the detection of dog and cat meat in meat mixtures and animal feed. J. food Sci., 68: 1757-1761.

5. Ahmed, M.M.M. (2005). PCR amplification of species-specific repeat for meat DNA identification via genetic markers in cattle and sheep. Biotechnol. Anim. Husbandry. 21: 1-11.

6. Ahmed, M.M.M. and El-Mezawy, A. (2005). Detection of species-specific genetic markers in farm animals meat by RFLP analysis of sytochrome b gene. Biotechnol. Anim. Husbandry. 21: 1-11.

7. Ahmed, M.M.M.; Abdel-Rahman, S.M.A. and El-Hanafy, A.A. (2007). Application of species-specific polymerase chain reaction and Cytochrome b gene for different meat species authentication. Biotech., 6: 426-430.

8. Alves, E.; Castellanos, C.; Ovilo, C.; Silio, L. and Rodriguez, C. (2002). Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. Meat Sci., 61: 157-162.

9. Arslan, A.; Ilhak, I.; Calicioglu, M. and Karahan, M. (2005). Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Journal of Muscle Foods.16: 37- 45.

10. Baradakci, F. and Skibinski, D.O.F. (1994). Application of the RAPD technique in talipia fish: species and subspecies identification. Heredity. 73: 117-123.

11. Fairbrother, K.S.; Hopwood, A. J.; Lockley, A.K. and Bardsley, R.G. (1998). Meat speciation by restriction fragment length polymorphisms analysis using Actin cDNA probe. Meat Sci., 50: 105-114.

12. Gracey, J.F.; Collins, D.S and Huey, R.J. (1999). Meat Hygiene. 10th Edn., W.B. Saunders Co. Ltd., London.

13. Herman, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. J. Dairy Res., 68: 429–436.

14. Hopwood, A.J.; Fairbrother, K.S.; Lockley, A.K. and Bardsley, R.G. (1999). An actin gene related polymerase chain reaction test for identification of chicken in meat mixtures. Meat Sci., 53(4): 227- 231.

15. Ibrahim, A.A. (2009). PCR based detection of genetically modified soy in processed foods commercially available in Saudi Arabia. Sultan Qaboos University Journal for Science. 4: 160-165.

16. Lawrie, R.A. and Ledward, D.A. (2006). The Stucture and growth of muscle: Lawrie's Meat Sci., 7th Edn., Woodhead publishing Ltd., Cambrige, England, pp: 42-74, 75-127.

species specifications. training manual of veterinary officers of U.P. Govt. under ATMA scheme conducted by department of Extension DUVASU, Mathura., pp: 63-67.

25. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. I. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. ISBN 0-87969-309-6.

26. Singh, V.P. and Sachan, N. (2010). Collection and dispatch of meat samples for vetrolegal cases. Traning Manual of Veterinary Officers of U.P. Govt. under ATMA Scheme, Department of Extension DUVASU, Mathra, pp: 63-67.

27. Singh, V.P. (2008a). Laboratory manual of meat and meat products technology (Including Poultry Products Technology. DUVASU, Mathura, pp: 1-6.

28. Singh, V.P. (2008b). Training booklet for Internship students on field oriented issues of livestock products technology. DUVASU, Mathura, pp: 20-23.

29. Singh, V.P. (2010). Livestok technology and service: Internship manual as per VCI syllabus. College of veteriary science and animal husbandry, Pt. D.D.U. Pashu Chikitsa Vigyan Vishwavidyalaya Evam Go Anusandhan Sansthan, Mathura, pp: 136-153.

30. Skrokki, A. and Hormi, O. (1994). Composition of minced meat. A. Methods. Meat sci., 3: 150-166.

31. Thornton, H. (1968). Textbook of meat inspection. 6th Edn., Tindall and Cassel, Bailliere, London.

17. Lenstra, J.A.; Buntjerand, J.B. and Janssen, F.W. (2001). On the origin of meat-DNA techniques for species identification in meat products. Vet. Sci., Tomorrow, 2: 1-15.

18. Mane, B.G.; Mendiratta, S.K.; Tiwari, A.K. and Bhilegaokar, K.N. (2012). Detection of adulteration of meat and meat products with buffalo meat employing polymerase chain reaction assay. Food Analytical Methods. 2: 296-300.

19. Matsunaga, T.; Chikuni, K.; Tanabe, R.; Muroya, S.; Shibata, K.; Yamada, J.; (1999). A quick and simple method for the identiWcation of meat species and meat products by PCR assay. Meat Sci., 51, 143–148.

20. Meyer, R.; Hofelein, C.; Luthy, J. and Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. Journal of AOAC International. 78: 1542–1551.

21. Pavel, K. and Eva, R. (2003). Identification of species-specific DNA in feedstuffs J. Agricultural and Food Chem., 70: 621-32.

22. Piknova, L. Kuchta, T. (2006). Concentration dependence of recovery rates of an exogenous short linear DNA fragment from soya flour. European Food Research and Technology. 223: 143-145.

23. Rao, K.B.C.A.; Rao, V.K.; Kowale, B.N. and Totey, S.M. (1998). Sex- specific identification of raw meat from cattle, buffalo, sheep and goat. Meat Sci., 48: 275-285.

24. Sachan, N. and Singh, V.P. (2010). Field techniques for meat

Basrah J. Agric. Sci. 2012, 25(2): 138-151

Detection of species adulteration in imported meat from farm animals and pork using polymerase chain reaction with species specific repeat (PCR-SSR)

Talib Ahmed Jaayid and Dhurgham Kamel Saker
College of Agriculture, University of Basrah (UOB), Iraq
taleb1968@yahoo.com

Abstract. This study was carried out at the molecular genetics Lab., college of agriculture, university of Basrah (UOB). The cow, buffalo, horse, donkey, sheep and pig meat were analyzed for detection and identification of meat adulteration in this species. DNA from meats samples (0.5 gram) was extracted and subjected to analysis using polymerase chain reaction (PCR) technique with species specific repeat (SSR). Examined primers by amplifying DNA of animals meat were confirmed on all meats. The results showed that extracted whole DNA genome and mitochondrial DNA for all species included in the study were very good quality and a high molecular weight which is one of the most basic requirements in molecular research, especially in the genetics fields. Amplification product has been detected of the encoding gene for SSR technique in cows and buffaloes meat as gave the same band in cows and buffaloes which appeared 603 bp in raw, canned and frozen meat. Also have been detected amplification of the encoded gene product for SSR technique of horses and donkeys, it gave the same band in both (221 bp) in raw meat samples only. Regarding sheep meat have been detected amplification product of the encoding gene for SSR technique, it gave amplification product that appeared 374 bp in raw and minced meat. Amplification product of the encoding gene for SSR technique gave specialist pig band which appeared 100 ≥ bp in raw meat samples that direct recognize succeefully in meat samples used in this study. These findings showed that molecular genetics techniques such as PCR with SSR technique are potentially reliable, much cheaper and faster for identification of meats in food control laboratories and detection of meat type in meat products for halal authentication.

Kew words: Specific species repeat, Polymerase chain reaction, Farm animal meats, Pig, Adulteration