سنجش مولکولی تقلب گوشت مرغ در همبرگر ممتاز به‌روش Simplex PCR و Duplex PCR

معصومه هاشم‌زادگان[۱]، سید ابراهیم حسینی[۲*]، فرزانه تفویضی[۳]، منصور بیات[٤]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد صنایع‌غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع‌غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۳. دانشیار گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[*]نویسنده مسئول مکاتبات: ebhoseini@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۱۲/۲۰)

چکیده

گوشت یک منبع پروتئین عالی و مغذی محسوب می‌شود اما به‌علت قیمت بالای این پروتئین حیوانی و دست‌یابی به سود اقتصادی بیشتر توسط برخی تولیدکنندگان، اغلب در فرآورده‌های گوشتی، تقلباتی نظیر استفاده از گونه‌های گوشتی با ارزش تجاری کمتر، مورد توجه است. در این تحقیق سعی شده تا پروتئین ارزان قیمتی نظیر گوشت مرغ به‌روش مولکولی شناسایی گردد. از ۱۰ نوع همبرگر ممتاز صنعتی با درج عنوان تهیه شده از گوشت گاو و نمونه‌های شاهد، شامل گوشت خام گاو و مرغ، استخراج DNA انجام گرفت و سپس واکنش‌های Simplex PCR و Duplex PCR بر روی DNAهای حصول یافته با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویژه ژن سیتوکروم b گاو و ۱۲s rRNA مرغ انجام شد. ژن‌های ویژه سیتوکروم b گاو و ۱۲s rRNA مرغ به‌ترتیب قطعات ۲۷٤ bp و ۱۸۳ bp را طی واکنش‌های Simplex-PCR و Duplex-PCR در تمام نمونه‌های همبرگر ممتاز تکثیر کردند. تکثیر قطعه ۱۸۳bp ویژه ژن مرغ طی واکنش‌های Simplex-PCR و Duplex-PCR، حاکی از جایگزینی تقلب مرغ با بخشی از گوشت گاو که ماده اصلی تمامی همبرگرهای ممتاز مورد آزمون است، می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گوشت مرغ، همبرگر ممتاز، Simplex-PCR، Duplex PCR

مقدمه

گوشت منبع مهمی از پروتئین، آمینواسیدهای ضروری و ریزمغذی‌های قابل جذب ازجمله آهن، روی، سلنیوم، ویتامین‌های B_6، B_{12} و D، مقادیر مهمی از امگا۳ و اسیدهای چرب غیراشباع است بنابراین منبع با ارزشی از نظر تغذیه‌ای محسوب می‌شود (Doosti *et al.*, 2011). باتوجه به قیمت بالای گوشت، امکان تقلب در مواد غذایی گوشتی با حذف کلی یا جزئی این ماده غذایی با ارزش و یا جایگزینی آن با مواد غذایی با ارزش غذایی پایین‌تر وجود دارد بنابراین شناسایی گونه‌های گوشتی تقلبی به‌منظور حمایت از حقوق مصرف‌کننده، جلوگیری از خسارات اقتصادی مصرف‌کننده، نقض اصول مذهبی و آسیب به سلامتی، اهمیت می‌یابد (Gazalli *et al.*, 2013).

مطابق قوانین کمیسیون اروپا، به‌منظور ایمنی مواد غذایی، نام تمام مواد اولیه مورد استفاده در مواد غذایی به‌ویژه فرآورده‌های گوشتی، بدون نیاز به ذکر میزان استفاده از آن‌ها، باید بر روی برچسب فرآورده درج گردد (Nollet, 2007; Eaqub Ali *et al.*,2012). یکی از فعالیت‌های مهم آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت مواد غذایی، توانایی شناسایی گونه‌های مختلف حیوانی در فرآورده‌های غذایی است. تعیین منشأ گونه‌های گوشتی در فرآورده‌های گوشتی، یک مهارت مهم در بهداشت و کنترل مواد غذایی است (Doosti *et al.*, 2011).

با توجه به مصرف روزافزون فرآورده‌های گوشتی خام از جمله همبرگر در کشور، کنترل کیفیت این محصولات از اهمیت خاصی برخوردار است (Abbasi Fasarani *et al.*, 2012). همبرگر مخلوطی از گوشت قرمز چرخ‌کرده دام‌های حلال گوشت به‌ویژه گاو و گوساله به‌همراه پروتئین گیاهی (سویا و گلوتن)، روغن، ادویه‌جات، مواد پرکننده و اتصال دهنده، نمک و سبزیجات معطر می‌باشد. مطابق «استاندارد ملی ایران»، همبرگرهای صنعتی ایران به یک گروه همبرگر معمولی و دو گروه همبرگر ممتاز طبقه‌بندی می‌شوند. همبرگرهای معمولی دارای حداقل ۳۰ درصد گوشت قرمز و مقادیر مشخص پروتئین گیاهی و سایر مواد متشکله مجاز می‌باشند، همبرگرهای ممتاز گروه اول شامل ۷٤-٦۰ درصد گوشت، فاقد پروتئین سویا و دارای ترکیبات مجاز هستند و همبرگرهای ممتاز گروه دوم حاوی ۹۵-۷۵ درصد گوشت، فاقد پروتئین سویا و دارای سایر ترکیبات مجاز می‌باشند (ISIRI, 2304/1991). بر اساس پروانه ساخت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران، فقط استفاده از گوشت گاو در تولید همبرگرهای صنعتی مجاز است (Hoseini *et al.*, 2009). اما متأسفانه به‌علت امکان اختلاط مرغ استخوان‌گیری مکانیکی شده با بافت چرخ شده پستانداران، وجود گوشت مرغ در همبرگر یکی از تقلبات مهم در این محصول محسوب می‌شود (Doosti *et al.*, 2014) تاکنون تکنیک‌های مختلفی به‌منظور شناسایی گوشت مرغ در فرآورده‌های گوشتی به‌کار برده شده است.

یافته‌های مطالعاتی نشان داد، شناسایی گوشت گاو، گوسفند و مرغ در همبرگرهای عرضه شده در شهر تهران به‌روش Sandwich ELISA زمان زیاد و تعداد نمونه مورد بررسی بالایی می‌طلبد، درصورتی‌که Duplex-PCR به‌میزان نمونه و زمان کمتری نیاز دارد (Hoseini *et al.*, 2009).

نتیجه بررسی گونه‌های گوشتی گاو، خوک و اسب در همبرگر با استفاده از روش Immunodifusion بیان‌گر صرف زمان زیاد برای استخراج پروتئین و عدم‌دسترسی همیشگی آنتی‌سرم است (Flores-Munguia *et al*., 2000). شناسایی تقلبات فرآورده‌های گوشتی صنعتی با روش Multiplex-PCR بیان‌گر آن بود که Multiplex-PCR روشی است که در مقایسه با سایر روش‌ها، سریع، اختصاصی و دارای محدوده شناسایی بسیار پایینی است (Ghovvati *et al*., 2009).

سنجش تقلبات گونه‌های گوشتی در همبرگر با روش PCR و RFLP-PCR با کمک آنزیم‌های هاضم، حاکی از قابل اعتماد بودن روش‌های مولکولی PCR و PCR-RFLP برای تشخیص نوع گوشت در محصولات گوشتی دارای نشان حلال است اما روش PCR-RFLP نسبت به Multiplex-PCR نیاز به زمان و هزینه بیشتری دارد (Doosti *et al*., 2011).

خواص منحصربه‌فرد DNA، مانند ثبات در هر سلول، توالی ویژه برای هرگونه و مقاوم بودن در برابر تیمارهای حرارتی و شیمیایی باعث شده تا روش‌های برپایه DNA (PCR)، به‌منظور شناسایی گونه‌های حیوانی در مواد غذایی به‌کار روند (Hiu, 2007). بهترین تکنیک مولکولی برای شناسایی منشأ گونه‌های گوشتی، روش PCR است که دارای عملکرد ساده، سریع، اختصاصی، تکرارپذیر و با قابلیت شناسایی پایین (به‌علت شناسایی DNA مورد نظر حتی در مقادیر کم) می‌باشد (Camma *et al*., 2012; Safdar *et al*., 2013; Sakaridis *et al*., 2013; Amaral *et al*., 2014; Chun *et al*., 2014; Karabasanavar *et al*., 2014).

در روش PCR دوگانه (Duplex PCR) یا چندگانه (Multiplex PCR)، دو یا چند توالی هدف با استفاده از دو یا چند پرایمر به‌طور هم‌زمان در یک مخلوط واکنش تکثیر می‌شوند (Pelt-Verkui *et al*., 2008).

در این تحقیق، جهت شناسایی تقلب گوشت مرغ در مواد اولیه تشکیل دهنده ۱۰ نوع همبرگر ممتاز (همبرگرهای حاوی حداقل درصد گوشت) عرضه شده در شهر تهران در سال ۱۳۹۲، روش اختصاصی Duplex-PCR با استفاده از پرایمر ویژه دو گونه حیوانی گاو و مرغ، به‌کار برده شده است. علت استفاده از روش مذکور، شناسایی هم‌زمان دو DNA هدف در مخلوطی از دو DNA طی یک واکنش PCR تک مرحله‌ای، کاهش تعداد واکنش‌ها، زمان و هزینه می‌باشد (Forte *et al*., 2005; Ghovvati *et al*., 2009; Kim *et al*., 2013).

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری

گوشت خام گاو و مرغ (نمونه‌های شاهد آزمون) از یکی از قصابی‌های شهر تهران، خریداری شدند. ۱۰ نوع همبرگر ممتاز از ۵ برند مختلف که دارای درصدهای مختلفی از گوشت بودند (برند اول با درصدهای گوشت ۶۰ و ۸۵، برند دوم با درصد گوشت ۶۰ و ۹۰، برند سوم با درصد گوشت ۶۰ و ۸۵ و ۹۰، برند چهارم با درصد گوشت ۷۵ و ۹۵ و برند پنجم با درصد گوشت۹۰) از سطح شهر تهران جمع‌آوری و کدگذاری و برای استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

- استخراج DNA

مقدار ۰/۰۶ گرم نمونه گوشت خام گاو، مرغ و نمونه‌های همبرگر وزن و داخل میکروتیوپ‌های ۱/۵ml استریل ریخته شدند. سپس آزادسازی DNA توسط ۶۰۰µl از بافر استخراج CTAB (EDTA ۰/۵M pH:۸ ۴ml، ۴M NaCl ۳۵ ml، ۱M Tris HCL pH:۸ ۱۰ ml و ۲g CTAB) و۵۰µl پروتئیناز K، داخل بن‌ماری ۶۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ ساعت انجام شد و نمونه‌ها در سانتریفوژ (Hettich, Germany) ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه، دوفاز گردیدند. پس از دو مرحله افزودن کلرفرم سرد معادل حجم فازرویی هر یک از نمونه‌های داخل میکروتیوپ، ورتکس ۱۶ ثانیه‌ای، شرایط سانتریفوژ مذکور، یک مرحله افزودن ۶۰۰µl ایزوپروپانول سرد، تکان دادن ۱۵ دقیقه‌ای، سانتریفوژ و تخلیه کامل میکروتیوپ، مواد آلی حذف شدند. با افزودن ۲۰۰ µl اتانول ۷۰ درصد سرد در هر میکروتیوپ، ۱۰ دقیقه تکان دادن بسیار آرام و سپس سانتریفیوژ، رسوب DNA غیرمحلول، حذف املاح و تغلیظ DNA صورت گرفت. با تخلیه محتویات میکروتیوپ‌ها و قرارگیری آن‌ها در انکوباتور (JIM, Britain) ۴۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه، باقی اتانول میکروتیوپ‌ها تبخیرگردید و رسوب DNA ظاهر شد. به‌منظور انحلال رسوب DNA، ۵۰ µl آب مقطر فاقد یون به هر میکروتیوپ افزوده شد (Sambrook, 1989).

بررسی کیفی DNA استخراج‌شده از نمونه‌های شاهد و همبرگرهای ممتاز با بارگذاری DNAها برروی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و بررسی کمی آن‌ها به‌وسیله نانودراپ (Thermo, USA) با بررسی نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر، انجام گردید.

- پرایمرهای الیگونوکلئوتید

برای شناسایی اختصاصی گوشت گاو و مرغ در نمونه‌های همبرگر ممتاز، با استناد به مقالات پرارجاع و معتبر Matsunaga و Dalmasso نام دو پرایمر مورد نیاز در این آزمون دریافت گردید و با نرم‌افزار Vector NTI بازبینی و به‌منظور اطمینان از صحت آن‌ها، در سایت NCBI تطبیق داده شد. در نهایت پرایمرهای مندرج در جدول (۱) جهت ساخت (شرکت تکاپو زیست) سفارش داده شدند.

جدول ۱)- توالی پرایمرها و اندازه قطعات تکثیر یافته با هر پرایمر در هرگونه

نام پرایمر	ژن‌ها	توالی پرایمر	وزن مولکولی	مرجع
پرایمر گاو	سیتوکروم b	Reverse: 5´CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG3´ Forward: 5´GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCT TGATGAAA3´	۲۷۴ bp	Matsunaga *et al.* (1999)
پرایمر ماکیان	12s rRNA	Reverse: 5´TGAGAACTACGAGCACAAAC 3´ Forward: 5´GGGCTATTGAGCTCACTGTT 3´	۱۸۳ bp	Dalmasso *et al.* (2004)

- بهینه‌سازی PCR اختصاصی ژن 12s rRNA گونه مرغ و ژن سیتوکروم‌b گونه گاو

به‌منظور دستیابی به تکثیر اختصاصی ژن 12s rRNA مرغ و سیتوکروم‌b گاو و حذف باندهای غیراختصاصی، بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها با در نظر گرفتن گرادیان دمایی ۵۰-۶۰ درجه سلسیوس، تغییر در تعداد چرخه‌های دمایی از ۳۰- ۳۵ بار و تغییر در غلظت پرایمرهای مورد استفاده صورت گرفت. هم‌چنین برای هر واکنش PCR، کنترل مثبت با DNA استخراج شده از نمونه‌های شاهد و کنترل منفی با به‌کارگیری آب مقطر در نظر گرفته شد. بهترین نتایج در دمای اتصال ۶۰ درجه سلسیوس و تعداد ۳۵ چرخه حاصل شد. همچنین به‌منظور جلوگیری از ایجاد واکنش تداخلی دو پرایمر اختصاصی سیتوکروم b گاو و 12s rRNA مرغ مورد استفاده در این مطالعه، بهینه‌سازی واکنش PCR با DNA غیرهدف نیز مورد آزمون قرار گرفت. بدین معنی که در بهینه‌سازی پرایمر اختصاصی ژن 12s rRNA جهت تشخیص گونه مرغ، پرایمر ژن 12s rRNA مرغ با DNA غیرهدف که همان DNA گونه گاو می‌باشد مورد آزمون قرار گرفت و بررسی عدم واکنش تداخلی پرایمر سیتوکروم‌b گونه گاوی نیز با DNA غیرهدف یعنی مرغ بررسی شد.

- Simplex PCR نمونه‌های همبرگر ممتاز

واکنش Simplex PCR، در ۲ مرحله مجزا و طی ۳ تکرار (به‌منظور اطمینان از صحت نتیجه آزمون)، برای هر DNA استخراج شده از نمونه‌های همبرگر با هر یک از پرایمرهای ویژه ژن‌های اختصاصی گاو و مرغ اجرا شد. آزمون PCR در حجم نهایی ۲۵ µl شامل ۲/۵ µl بافر 10x PCR، ۱/۵ µl $MgCl_2$، ۰/۵ µl dNTP، ۰/۵ µl Taq پلیمر از (Fermentase, USA)، ۰/۵ µl (۰/٤ میکرومولار) از پرایمر اختصاصی ژن 12s rRNA مرغ و سیتوکروم‌b گاو و ۵۰ ng از DNA نمونه‌های استخراج شده، انجام شد.

تکثیر DNA های استخراج شده از نمونه‌های همبرگر ممتاز، برای هر دو پرایمر مذکور، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad PCR System, USA)، مطابق برنامه دمایی- زمانی مرحله دناتوراسیون ابتدایی در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، ۳۵ چرخه اتصال پرایمر شامل اعمال دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، دمای ۶۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱/۵ دقیقه صورت گرفت و در پایان مرحله گسترش نهایی پرایمر با اعمال دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR، پس از رنگ‌آمیزی با gel red بر روی ژل آگارز ۲ درصد در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE (Tris Base, Boric acid, Na EDTA, Deionized Water) با ولتاژ ۱۰۰V به‌مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید که نتایج به‌وسیله دستگاه ژل داک (UV TEC, Britain) مشاهده شد.

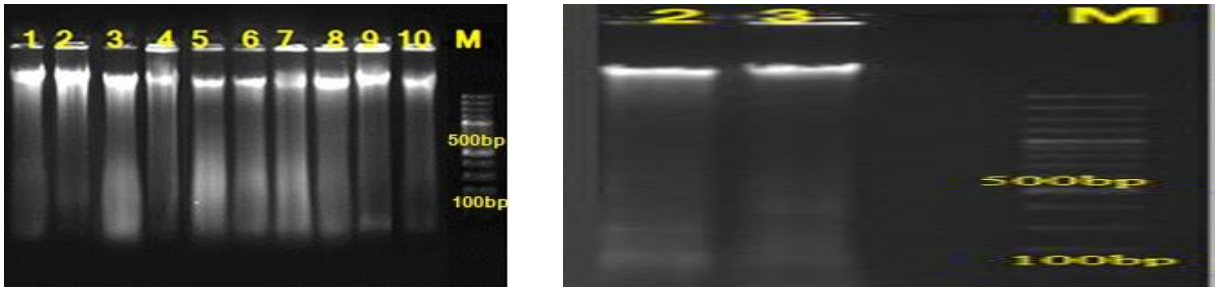
- Duplex PCR نمونه‌های همبرگر ممتاز

در این واکنش با استفاده هم‌زمان از دو پرایمر اختصاصی ژن 12s rRNA مرغ و سیتوکروم‌b گاو در حجم و شرایط فوق‌الذکر، هر دو گونه شاهد و نمونه‌های همبرگر مورد مطالعه، تکثیر شدند.

یافته‌ها

- بررسی کیفی DNA استخراج شده

DNA استخراج شده از نمونه‌های شاهد و همبرگرهای ممتاز بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز، بارگذاری گردیدند که بخشی از نتایج در شکل (۱) قابل مشاهده است.



الف ب

شکل (۱)- الف: DNA استخراج شده ۱۰ نوع همبرگر ممتاز، چاهک‌های ۱۰-۱: به‌ترتیب نمونه‌های ۱۰-۱ همبرگرهای ممتاز؛ M: مارکر ۱۰۰bp.
ب: استخراج DNA گوشت‌های گاو و مرغ خام (شاهد) : چاهک ۲: DNA گوشت گاو؛ چاهک ۳: DNA گوشت مرغ؛ M: مارکر ۱۰۰ bp.

- بررسی عملکرد اختصاصی پرایمرهای ژن ۱۲s rRNA مرغ و ژن سیتوکروم b گاو

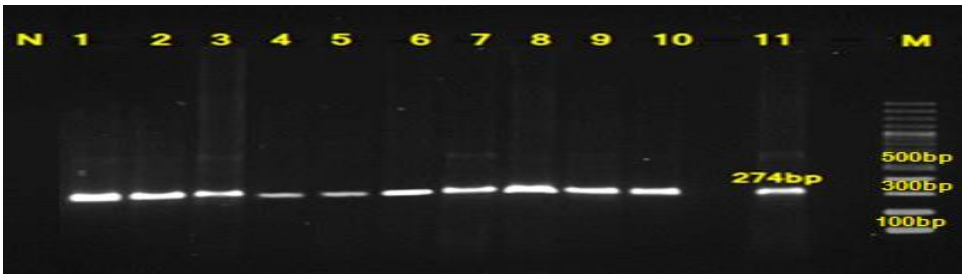
به‌منظور اطمینان از عملکرد اختصاصی پرایمرهای اختصاصی ژن ۱۲s rRNA مرغ و ژن سیتوکروم b گاو و عدم واکنش متقاطع این دو پرایمر، Simplex-PCR هر پرایمر با هردو DNA شاهد (گوشت مرغ و گاو) طی سه بار تکرار آزمون، انجام شد. نتایج Simplex-PCR هر پرایمر با DNAهای گونه هدف و غیرهدف، در شکل (۲) ارائه شده است.

ب الف

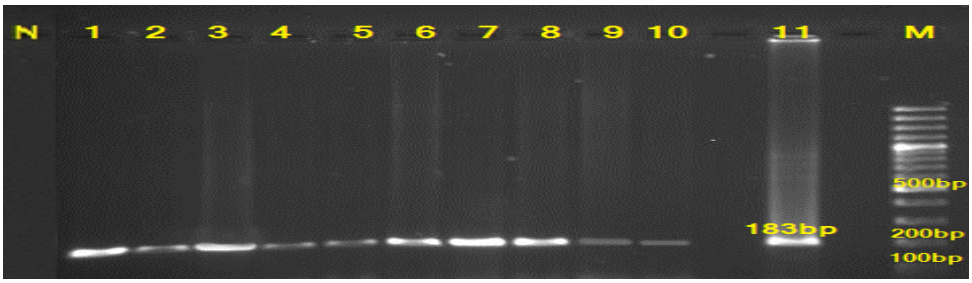
شکل(۲)- الف: پروفایل محصول PCR جهت تأیید عدم وجود واکنش‌سازی پرایمرها و تکثیر قطعه ۲۷٤ bp اختصاصی ژن سیتوکروم b گونه گاو بر روی ژل آگارز ۲ درصد، N: کنترل منفی، M: مارکر ۱۰۰ bp، چاهک ۱: عدم انجام PCR با DNA غیرهدف (مرغ)، چاهک۲: تکثیر قطعه ۲۷٤ bp با DNA هدف گونه گاو.
ب: پروفایل محصول PCR جهت تأیید عدم وجود واکنش متقاطع پرایمرها و تکثیر قطعه ۱۸۳ bp اختصاصی ژن s rRNA1 2 گونه مرغ بر روی ژل آگارز ۲ درصد، M: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۱: عدم انجام PCR با DNA غیرهدف (گاو)، چاهک۲: تکثیر قطعه ۱۸۳ bp با DNA هدف گونه گاو، N: کنترل منفی

Simplex PCR- نمونه‌های همبرگر ممتاز با پرایمر اختصاصی گونه گاو و ۱۲s rRNA مرغ

نتایج حاصل از تکثیر قطعه ۲۷٤bp ژن سیتوکروم b گاو طی واکنش simplex PCR توسط پرایمر اختصاصی گونه گاو و تکثیر قطعه ۱۸۳ bp ژن ۱۲s rRNA مرغ طی واکنش simplex PCR توسط پرایمر اختصاصی گونه مرغ با DNA استخراج شده از نمونه‌های همبرگر ممتاز بر روی ژل آگارز ۲ درصد در شکل (۳) نمایش داده شده است.



الف



ب

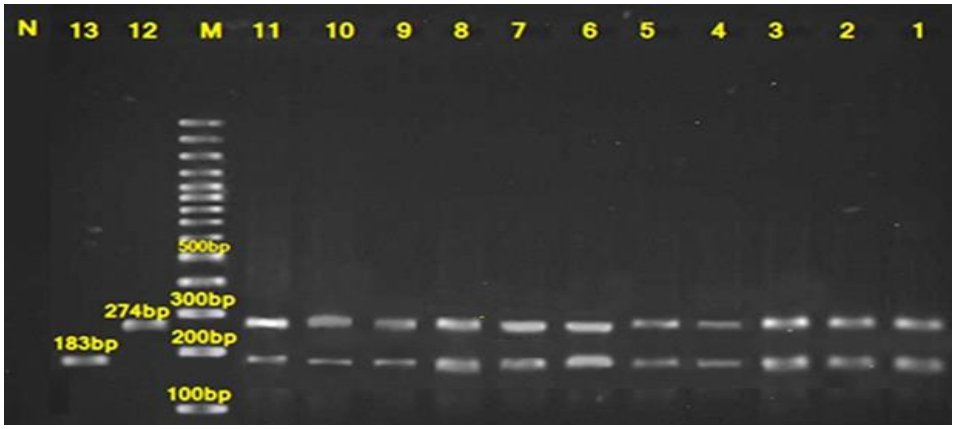
شکل(۳)- الف) نمایش پروفایل Simplex-PCR ۱۰ نوع همبرگر ممتاز با پرایمر اختصاصی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی گونه گاو و تکثیر قطعه ۲۷٤bp، بر روی ژل آگارز ۲ درصد، N: کنترل منفی، چاهک‌های ۱۰-۱: انواع ۱۰-۱ همبرگرهای ممتاز، چاهک ۱۱: کنترل مثبت با DNA گاو، M: مارکر bp ۱۰۰.

ب) نمایش پروفایل Simplex-PCR ۱۰ نوع همبرگر ممتاز با پرایمر اختصاصی ژن ۱۲s rRNA گونه مرغ و تکثیر قطعه ۱۸۳bp، بر روی ژل آگارز ۲ درصد، N: کنترل منفی، چاهک‌های ۱۰-۱: انواع ۱۰-۱ همبرگرهای ممتاز، چاهک ۱۱:کنترل مثبت با DNA مرغ، M: مارکر bp ۱۰۰.

Duplex PCR-

- نمونه‌های همبرگر و شاهد

Duplex PCR با DNA استخراج شده از نمونه‌های شاهد (گوشت گاو و مرغ) همبرگرهای ممتاز انجام گردید که نتیجه آن در شکل (٤) قابل مشاهده است.



شکل (٤)- نمایش پروفایل Duplex PCR ۱۰ نوع همبرگر ممتاز با پرایمر اختصاصی ژن سیتوکروم‌b گونه گاو و تکثیر قطعه bp ۲۷٤ و پرایمر اختصاصی ژن ۱۲s rRNA گونه مرغ و تکثیر قطعه ۱۸۳bp، بر روی ژل آگارز۲ درصد، N: کنترل منفی، چاهک‌های ۱۰-۱: انواع ۱۰-۱ همبرگرهای ممتاز، چاهک ۱۱: Duplex PCR گونه‌های شاهد، M: مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۱۲: کنترل مثبت با DNA گاو، چاهک ۱۳: کنترل مثبت با DNA مرغ

بحث و نتیجه‌گیری

در آنالیز PCR، شناسایی قطعه تکثیر شده به‌منظور اطمینان از تطابق DNA تکثیر شده با توالی هدف انتخابی، مرحله‌ای ضروری به‌شمار می‌رود (Zilio Dinon *et al*., 2010). PCR اختصاصی بر روی DNA استخراج‌شده از گوشت گاو و مرغ (نمونه‌های شاهد) بیانگر عملکرد اختصاصی پرایمرهای ویژه ژن سیتوکروم b گاو و ژن ۱۲s rRNA مرغ می‌باشد، زیرا پرایمر ویژه ژن سیتوکروم‌b گونه گاو فقط قادر به تکثیر قطعه ۲۷٤٤bp در گوشت گاو بود هم‌چنین پرایمر ویژه ژن ۱۲s rRNA مرغ فقط قادر به تکثیر قطعه bp ۱۸۳ در گوشت مرغ شد یعنی پرایمر اختصاصی هرگونه فقط با گونه اختصاصی خود تشکیل باند داد.

به‌منظور تأیید وجود گوشت گاو در همبرگرهای ممتاز مورد بررسی، آزمون PCR با پرایمر اختصاصی ژن سیتوکروم‌b گونه گاوی بر روی DNAهای استخراج شده از ۱۰ نمونه همبرگر ممتاز آزمون، انجام گرفت. تکثیر قطعه bp ۲۷٤ ژن سیتوکروم‌b در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، حاکی از وجود گوشت گاو بر طبق برچسب اعلان شده برروی نمونه‌ها بود. از سویی نتایج حاصل از PCR اختصاصی ژن ۱۲s rRNA گونه مرغ، نشانه تکثیر قطعه bp ۱۸۳ در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه بود که بیانگر استفاده از گوشت مرغ در تمامی نمونه‌های همبرگر ممتاز مورد مطالعه، به‌عنوان جایگزین بخشی از گوشت گاو مصرفی در محصول و نمایان شدن تقلب در محصولات برخلاف برچسب حک شده برروی آن‌ها می‌باشد.

Duplex PCR بر روی DNA گونه‌های شاهد و نمونه‌های ۱۰ نوع همبرگر ممتاز انجام شد. بدون هیچ واکنش متقاطعی پرایمر اختصاصی ژن ۱۲s rRNA مرغ، قطعه ۱۸۳bp و پرایمر اختصاصی ژن سیتوکروم‌b گاو، قطعه ۲۷٤bp را در تمام نمونه‌های همبرگر ممتاز مورد

بررسی، تکثیر کردند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تمام نمونه‌ها علاوه بر گوشت قرمز، حاوی مرغ نیز بودند. با توجه به‌ذکر عنوان همبرگر ممتاز بر روی برچسب مندرج همبرگرهای مورد آزمون و نیز تعریف موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی از همبرگر ممتاز (حاوی گوشت قرمز با مقادیر ٦٠ درصد به بالا) و بر اساس پروانه ساخت وزارت بهداشت، فقط استفاده از گوشت گاو در تولید همبرگرهای صنعتی مجاز است بنابراین نباید هیچ میزان از گوشت مرغ در نمونه‌ها وجود داشته باشد (ISIRI, 2304/1991; Hoseini *et al.*, 2009). مغایر بودن نتایج آزمون با استاندارد، نشان دهنده وجود تقلب در تمام همبرگرهای ممتاز مورد بررسی در این تحقیق است. با بررسی نتایج حاصل از آزمون‌های Simplex PCR و Duplex PCR می‌توان گفت نتایج این دو آزمون ۱۰۰ درصد باهم مطابقت داشتند.

لازم به‌ذکر است که نتایج حاصل از بررسی گوشت مرغ در همبرگر با روش‌های مختلف نتایج مشابهی را نشان داده‌اند. در سال ۱۹۹۹ تعداد ۱۲۰ نمونه فرآورده گوشتی به‌روش PCR مورد بررسی قرار گرفت و گزارش حاکی از آن بود که ٣٤ نمونه از نظر نوع گوشت به‌کار رفته با برچسب محصول انطباق ندارد (Matsunaga *et al.*, 1999).

در سال ۲۰۰۰، تقلبات گونه‌های گوشتی گاو، خوک و اسب جایگزین در ۲۳ نمونه همبرگر (که بر روی برچسب همه آن‌ها ۱۰۰ درصد گوشت گاو درج شده بود)، با استفاده از روش Immunodifusion مورد بررسی قرار گرفت. در ۹ مورد از نمونه‌های همبرگر، گوشت اسب مشاهده شد که بر روی برچسب هیچ‌یک، وجود این‌گونه درج نشده بود (Flores-Munguia *et al.*, 2000).

هم‌چنین در سال ۲۰۰۹، شناسایی گوشت مرغ در گوشت و محصولات گوشتی به‌روش PCR با استفاده از جفت پرایمر ویژه طراحی شده بر پایه ژن D-loop میتوکندریایی محصولات گوشتی و گوشت اتوکلاو شده و فرآوری شده، انجام شد. این آزمون به‌طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی گوشت مرغ تا ۱ درصد تقلب در محصولات گوشتی مخلوط مثل کلوچه گوشتی و کباب و ... اجرایی شد (Mane *et al.*, 2009).

در بررسی دیگری که در سال ۲۰۰۹ بر روی گوشت مورد استفاده در تولید همبرگرهای عرضه شده در شهر تهران با روش Sandwich ELISA صورت گرفت؛ انواع اختلاط گوشت مرغ، گاو و گوسفند در نمونه‌ها مشخص شد و ٤٣/٨ درصد نمونه‌های همبرگر صنعتی با فرمول پروانه ساخت و برچسب محصول مطابقت نداشتند (Hoseini *et al.*, 2009). در سال ۲۰۱۳، به شناسایی گوشت مرغ و بوقلمون در مخلوط‌های گوشتی خام و حرارت دیده با استفاده از دو تکنیک TaqMan و Real-time PCR پرداخته شد. در هر دو روش نتایج برای شناسایی آلودگی اتفاقی در فرآورده‌های گوشتی (۰/۱ درصد) کافی بود اما روش Real-time PCR به‌واسطه حساسیت بیشتر و قابلیت اجرای بیشتر و زمان کمتر و اندازه‌گیری کمّی، مناسب‌تر است (Kesmen *et al.*, 2013).

شناسایی گونه گوشتی به‌روش‌های ایمونولوژیکی مانند Sandwich ELISA و Immunodifusion (که در مطلب فوق اشاره شد) نمایانگر آن است که هر دو روش نسبت به‌روش PCR زمان بیشتری را می‌طلبند.

هم‌چنین در این دو روش ایمونولوژیکی، امکان شناسایی هم‌زمان دو گونه گوشت (گاو و مرغ) وجود ندارد و برای هر یک آزمون جداگانه‌ای باید انجام داد درصورتی‌که در آزمون Duplex PCR امکان شناسایی هر دو گونه به‌طور هم‌زمان و طی یک واکنش امکان‌پذیر است که این امر نیز خود باعث کاهش اتلاف زمان خواهد شد (Flores-Munguia *et al*., 2000; Hoseini *et al*., 2009).

به‌طورکلی باید اشاره کرد که روش‌های شناسایی ترکیبات درج شده بر روی برچسب ترکیبات تشکیل‌دهنده همبرگر، بر پایه شناسایی پروتئین (شامل سنجش‌های ایمونولوژیکی، تکنیک‌های الکتروفروتیکی و کروماتوگرافی) یا DNA هستند (Stamoulis *et al*., 2010). پروتئین‌ها وابسته به بافتی هستند که از آن استخراج و جداسازی می‌شوند بنا براین در همه بافت‌ها ساختار یکسانی ندارند (Ghovvati *et al*., 2008). درصورتی‌که DNA یک مولکول نسبتاً پایدار است و ساختار خود را در همه سلول‌ها و بافت‌ها حفظ می‌کند و می‌توان آن را از تمام بافت‌ها استخراج نمود (Abd EL-Nasser., 2010). بنابراین از روش PCR که مبتنی بر بررسی DNA است در این تحقیق استفاده شد که علاوه بر ثبات DNA نسبت به پروتئین، امکان استخراج آن از هر نقطه‌ای از بافت همبرگر وجود دارد. هم‌چنین روش PCR به‌علت حساس و ویژه بودن، توانایی شناسایی مقادیر بسیار اندک DNA را در محصولات خام و فرآوری شده دارد که باعث می‌شود در شناسایی تقلبات مواد غذایی کاربرد داشته باشند (Mafra *et al*., 2008).

هدف از این تحقیق به‌کار بردن یک روش سریع و کم هزینه (به‌واسطه جایگزینی یک آزمون تک‌مرحله‌ای به‌جای دو آزمون مجزا) برای شناسایی گونه پروتئین گوشتی غیرمجاز افزوده شده به همبرگر ممتاز بود. باتوجه به نتایج حاصل شده می‌توان گفت حساسیت، عملکرد اختصاصی و قابلیت تکرارپذیری، این روش را برای تجزیه و تحلیل سریع تقلبات در همبرگر مناسب می‌کند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که روش PCR را می‌توان جهت شناسایی منشأ پروتئین‌های حیوانی و بررسی و کنترل کیفیت فرآورده‌های گوشتی نظیر سوسیس، کالباس، ناگت و ... به‌کار برد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abbasi Fasarani, M., Hoseini, H., jahedkhaniki, Gh., Adibmoradi, M. Eskandari Gharabloo, S. (2012). The study of presence of illegal structure in industrial hamburgers contains 30 and 60 percent of meat by histological method and its relationship with chemical indicators belonging to the connective tissue of meat. Journal of Nutrition and Food Technology, 7(5):311-318. [In Persian]
- Abd El-Nasser, M., Labieb, H. Y. and Abd El-Aziz, D. M. (2010). Detection of native and modified soybean in some meat products in Assiut city, Egypt. Assiut University Bull Environ Research, 13(1): 27-35.

- Amaral, J. S., Santos, C. G., Melo, V. S., Oliveira, M. B. P. P. and Mafra, I. (2014). Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. Food Research International, 60: 140-145.
- Cammà, C., Di Domenico, M. and Monaco, F. (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. Food Control, 23: 400-404.
- Chun Chi, L., Lai Ling, F., Po Kwok, Ch., CheukMana, L., Kwok Fai, Ch. and Shuk Han, Ch. (2014). A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species. Meat Science, 96: 922–929.
- Dalmasso, A., Fontanellab, E., Piattib, P., Civeraa, T., Rosatic, S. and Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes, 18: 81–87.
- Doosti, A., Ghasemi Dehkordi, P. and Rahimi, E. (2014). Molecular assay to fraud identification of meat products. Food Science Technology, 51(1): 148-152.
- Eaqub Ali, M., Hashim, U., Mustafa, S. and Man, Y. (2012). Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome b gene for semi quantitative detection of pork in commercial meat products. Food Analysis Methods, 5: 613–623.
- Flores-Munguia, M. E., Bermudez-Almada, M. C. and Vazquez-Moreno, L. (2000). A research note: Detection of adulteration in processed traditional meat products. Muscle Foods, 11: 319-325.
- Forte, V. T., DiPinto, A., Martino, C., Tantillo, G. M., Grasso, G. and Schena, F. P. (2005). A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. Food Control, 16: 535–539.
- Gazalli, H., Malik, A. H., Jalal, H., Afshan, S., Mir, A. and Ashraf, H. (2013). Methods of identification of meat species. Food Nutrition And Safety, 3(2): 90-110.
- Ghovvati, S., Nassiri, M. R., Mirhoseini, S. Z., Heravi Moussavi, A. and Javadmanesh, A. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control, 20: 696–699.
- Hoseini, H., Barazandegan, Kh., Akhoondzadeh, A., Shemshadi, B., tavakoli, H. and Khaksar, R. (2009). Determination the kind of meat content of Patties marketed in Tehran in 2009. Journal of Food Science and Technology, 3: 95-100. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (1991). Frozen raw hamburger properties. 3th revision, ISIRI No. 2304. [In Persian]
- Karabasanavar, S. N., Singh, S. P., Kumar, D. and Shebannavar, S. (2014). Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. Food Chemistry, 145: 530–534.
- Kim, J., Jeong, D., Kim, Y., Kwon, Y., Rhee, G., Zhang, D. *et al.,* (2013). Development of a multiplex PCR method for testing six GM soybean events. Food Control, 31: 366-371.
- Kesmen, Z., Celebi, Y., Güllüce, A. and Yetim, H. (2013). Detection of seagull meat in meat mixtures using real-time PCR analysis. Food Control, 34: 47-49.
- Mafra, I., Ferreira, I. and Oliveira, B. (2008). Food authentication by PCR-based methods, Springer-Verlag. Europian Food Research and Technology, 227: 649–665.
- Mane, B. G., Mendiratta, S. K. and Tiwari, A. K. (2009). Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. Food Chemistry, 116: 806–810.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabeb, R., Muroyab, S., Shibata, K., Yamadaa, J. *et al.,* (1999). A quick and simple method for the identication of meat species and meat products by PCR assay. Meat science, 51: 143-148.
- Nollet, L. (2007). Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality, Blackwell, Ames, pp. 587-694.
- Pelt-Verkuil, E. V., Belkum, A. V. and P. Hays, J. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Trends Food Science and Technology, 9: 380–388.

- Safdar, M. and Abasıyanık, M. F. (2013). Development of fast multiplex real-time PCR assays based on EvaGreen fluorescence dye for identification of beef and soybean origins in processed sausages. Food Research International, 54: 1652–1656.
- Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Argiriou, A. and Tsaftaris, A. (2013). A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis. Meat Science, 94: 84-88.
- Sambrook, J., Fritch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. Cold spring Habor Laboratory Press, New York, pp. 3-15.
- Stamoulis, P., Stamatis, C., Sarafidou, T. and Mamuris, Z. (2010). Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. Food Control, 21: 1061-1065.
- Zilio Dinon, A., Treml, D., Souza de Mello. C. and Carolina Maisonnave Arisi, A. (2010). Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007 to 2008. Food Composition and Analysis, 23: 226 -229.

Molecular assay of chicken meat fraud in premium burgers by Simplex and Duplex PCR

Hashemzadegan, M.[1], Hosseini, E.[2*], Tafvizi, F.[3], Bayat, M.[4]

1. M.Sc. Graduate in Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associated Professor of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associated Professor of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
4. Associated Professor of Microbiology, Sciences and Researches Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[*]Corresponding Author's E.mail: ebhoseini@yahoo.com
(Received: 2017/2/28 Accepted: 2018/3/11)

Abstract

Meat is considered an excellent and nutritious source of protein. However, due to the high cost of this animal protein and economic profit access of some producers, frauds like usage meat species of commercially lower value are noticeable. The aim of this study is to identify low-cost protein frauds such as chicken meat by the molecular method. DNA was extracted from 10 kinds of industrial premium beef burgers, and control samples involved raw beef and chicken meat. Then, simplex-PCR and duplex-PCR were run on the extracted DNA using specific primers of cytochrome b gene in beef and 12s rRNA gene in chicken. Specific genes of beef cytochrome b and chicken 12s rRNA amplified 274 bp and 183 bp fragments respectively in all premium burger samples in simplex-PCR and duplex-PCR. Amplification of fragments of 183 bp by simplex and duplex-PCR suggests adulteration of premium hamburgers by partial replacement of beef with chicken.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Chicken meat, Premium hamburger, Simplex-PCR, Duplex-PCR