تشخیص وجود مشتقات خوکی در نمونه‌های گوشت و غذاهای بسیار فرآوری شده مشکوک با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی

الهام ملکی[۱]، محمد قربانی[۲*]، محمد حمید[۳]، علیرضا صادقی ماهونک[۴]، مرتضی خمیری[۵]

۱- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی
۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی
۳- استادیار، انیستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی
٤- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی
۵- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۵/۰۲)

چکیده

تشخیص وجود اجزای خوکی در فرآورده‌های غذایی دیگر به ویژه در کشورهای اسلامی و در غذاهای حلال اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی بر مبنای سایبرگرین جهت تشخیص DNA خوک در گوشت و مشتقات بسیار فراوری شده خوک مانند ژلاتین و محصولات حاوی ژلاتین استفاده شد. این روش از پرایمرهای جدید اختصاصی که توسط نرم افزار AlleleID7 طراحی شده‌اند را بکار می‌برد که قطعه‌ای ۱۱٤ جفت بازی از ناحیه D-loop میتوکندری خوک را تکثیر می‌کند. پس از بهینه‌سازی ترکیب مخلوط و برنامه دمایی جهت حداکثر فلوروسانس و حداقل چرخه آستانه، منحنی استاندارد سری رقت تهیه شده از DNA استخراج شده از گوشت خوک، توان تشخیص رقت ۰/۰۰۱ در مقایسه با DNA اولیه را با کارایی ۹۲٪ نشان داد. اختصاصی بودن روش با آزمایش DNA استخراج شده از گوسفند، گاو، مرغ و ماهی ارزیابی شده و هیچ گونه تکثیری در نمونه‌های کنترل منفی دیده نشد. جهت ارزیابی این روش در تشخیص مشتقات خوکی در غذاهای بسیار فرآوری شده چند نمونه پودر و ورق ژلاتین انتخاب شدند و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی بر مبنای سایبرگرین در تشخیص تمام آنها موفق بود.

کلیدواژگان: غذاهای حلال، خوک، ژلاتین، تشخیص، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان‌واقعی

* مسئول مکاتبات: moghorbani@yahoo.com

۱- مقدمه

ژلاتین محصولی پروتئینی است که توسط دناتوراسیون جزیی پروتئین رشته‌ای کلاژن از پوست، استخوان و بافت‌های پیوندی حیواناتی مانند گاو و خوک استخراج می‌شود. در تولید آن اسید و قلیای رقیق برای تیمار مواد اولیه حیوانی و شکستن بخشی از اتصالات عرضی و تغییر ساختار به کار می‌رود و سبب تشکیل کلاژن محلول در آب گرم به نام ژلاتین می‌شود [۱]. به علت دارا بودن خصوصیات تشکیل ژل، تغلیظ‌کنندگی و پایدارکنندگی، ژلاتین به صورت معمول به عنوان عامل اتصال‌دهنده و لعاب‌دهنده در انواع زیادی از محصولات غذایی مانند مارشمالو، شیرینی‌ها، دسرهای بر پایه آب و فرآورده‌های گوشتی و در صنایع دارویی در ساخت کپسول‌های سخت و نرم، قرص‌ها، محصولات رژیمی و پوشش‌های محافظ داروها به کاربرده می‌شود[۲و ۳]. در اروپا حدود ۸۰ درصد ژلاتین خوراکی از پوست خوک تولید می‌شود اما ژلاتین گیاه خواران، حلال و کوشر[1] از جلبک دریایی، استخوان‌های ماهی و منابع غیرخوکی نیز در دسترس می‌باشد [٤]. وجود گوشت و مشتقات خوکی اظهار نشده شامل لارد، پلاسمای خون، کلاژن و ژلاتین نگرانی عمده‌ایی را برای پیروان ادیان اسلام و یهود به وجود می‌آورد زیرا خوک اکیدا در غذاهای آنها ممنوع است [٥]. تعیین گونه در محصولات جانبی حیوانی عمدتا توسط آنالیزهای DNA یا پروتئین صورت می‌گیرد. روش‌های بر پایه پروتئین منجر به نتایج رضایت‌بخشی در شناسایی گونه در گوشت‌های خام می‌شوند اما در مورد غذاهایی فرآوری حرارتی شده، به علت دناتوراسیون پروتئین و تغییرات اپی‌توپ‌های خاص محدودیت‌هایی دارند [٦]. این تکنیک‌ها شامل ELISA[2] که بر اساس واکنش‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی استوار است [۷]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC[3] [۸] و طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)[4] می‌باشد. اخیرا آنالیز با صحت بالای پپتیدهای بیومارکر توسط کروماتوگرافی مایع جفت‌شده با طیف‌سنجی جرمی جهت شناسایی گونه در محصولات فرآوری شده حرارتی پیشنهاد شده است [۹]. البته هزینه بالای تجهیزات و نیاز به تکنسین‌های متخصص از معایب این روش است. علاوه بر این در محصولات بسیار فراوری شده‌ای مانند ژلاتین، آنالیزهای بر پایه پروتئین ممکن است دناتوراسیون فزاینده مارکرهای پروتئینی ناشی از تیمار شدید دما و pH در حین تولید را مخفی نموده و سبب از دست رفتن ناهمگنی و خاصیت آنتی‌ژنی شود. به علت پایداری بیشتر DNA، آنالیزهای بر پایه DNA می‌توانند جایگزین گردند[۱۰].

هدف از انجام این پژوهش بررسی کارایی پرایمر جدید طراحی شده در ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری خوک در تشخیص گونه خوک در انواع گوشت و غذاهای بسیار فرآوری شده حاوی مشتقات خوکی مانند ژلاتین می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- جمع‌آوری نمونه‌ها

گوشت تازه گاو، مرغ، ماهی و گوسفند از بازار کرج خریداری شد و تا زمان استخراج در دمای انجماد۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گوشت تازه شکار شده گراز وحشی (*Sus scrofa*) نر، از جنگل‌های چالوس در استان مازندران در فصل تابستان تهیه شد. ژلاتین خالص گاوی و خوکی از سیگماآلدریچ تهیه گردید. ۸ نمونه تجاری پودر و ورق ژلاتین، و ۷ نمونه محصولات حاوی ژلاتین مانند مارشمالو و پاستیل و ژله‌های آماده مصرف از برندهای مختلف که روی برچسب آنها ژلاتین

1. Kosher
2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
3. High Performance Liquid Chromatography
4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

خوکی درج شده بود از فروشگاه سینزبری[5]در گلاسکو اسکاتلند خریداری گردید و تا زمان استخراج DNA در یخچال نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های گوشت و ژلاتین با استفاده از کیت innuPREP DNA Mini Kit (آلمان) با اعمال اصلاحاتی در پروتکل جهت بهینه کردن مقدار و خلوص DNA به صورت زیر انجام شد. ۵۰ میلی‌گرم از گوشت و ۱۰۰ میلی‌گرم پودر و ورق یا محصول حاوی ژلاتین در یک لوله آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتر توزین شد. در مورد نمونه‌های گوشت، پیش از استخراج، خرد کردن بافت در میکروتیوب صورت گرفت. ٤۰۰ میکرولیتر از محلول TLS و ۲۵ میکرولیتر پروتئیناز K به آن افزوده شده و پس از ۵ ثانیه ورتکس، به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای نمونه‌های گوشت و جهت نمونه‌های غذایی حاوی ژلاتین تا ٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. مخلوط حاصل به مدت یک دقیقه با سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت (مایع رویی) به یک لوله آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و ٤۰۰ میلی‌لیتر از TBS به سوپرناتانت اضافه شده و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس گردید تا شرایط اتصال DNA به ستون فیلتر فراهم شود. سپس اسپین فیلتر در لوله پذیرنده کیت قرار داده و محلول حاصله به صورت مرحله به مرحله به اسپین فیلتر اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید تا همه محلول به اتمام برسد. برای شستشو ۵۰۰ میکرولیتر از محلول HS به اسپین فیلتر اضافه شد و در ۱۲۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر از MS عمل سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه صورت گرفت. جهت خارج کردن اتانول بر طبق پروتکل، اسپین فیلتر در یک تیوب گیرنده جدید قرار داده شد و در ۱٤۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر اسپین فیلتر در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر قرار داده شده و برای نمونه‌های بافت و غذایی به مقدار بین ۱۰۰-۲۰ میکرولیتر بافر شوینده[6] اضافه شده و به مدت یک دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. نهایتا در ۸۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید. DNA استخراج شده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA پیش از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی توسط اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج‌های ۲٦۰، ۲۸۰و ۲۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ صورت گرفت و تنها نمونه‌هایی که میزان نسبت A260/A280 بین ۲-۱/۷ داشتند برای انجام آزمون انتخاب گردیدند.

۲-۳- طراحی پرایمر

برای تشخیص DNA خوک از سایر گونه‌ها، توالی ژنوم میتوکندری گاو *Bos Taurus* و خوک *Sus scrofa* از پایگاه داده NCBI[7] به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ استخراج و توسط نرم‌افزار آنلاین clustalw2 این دو توالی همردیف[8]گردیدند. ناحیهD-loop ژنوم میتوکندری خوک جهت طراحی پرایمر انتخاب شده و با استفاده از نرم افزار AlleleID7 پرایمرهای مختص به گونه خوک در این ناحیه طراحی شد و سپس برای ارزیابی اختصاصی بودن پرایمر از امکان BLAST[9]-Primer در سایت NCBI استفاده گردید. پرایمرهای طراحی شده قطعه‌ای ۱۱٤جفت‌بازی در ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری خوک را تکثیر می‌نماید که توالی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است. سنتز پرایمرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شده و رقیق‌سازی هر کدام از آنها با غلظت ۵ میلی‌مول در لیتر در آب مقطر استریل صورت گرفت و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

5. Sainsbury

6. Elution buffer
7. National Center for Biotechnology Information
8. Align
9. Basic Local Alignment Search Tool

Table 1 Designed Primers for Amplification of porcine mitochondrial DNA

Primer	Sequence($5' \rightarrow 3'$)	Tm
Sense Primer	CAACCAAAACAAGCATTCCATTC	56.4
Anti-Sense Primer	GGGTCACATATTTGTATGTTTGTG	55.5

Table 2 Optimum Real-time PCR Condition with SyberGreen dye for amplification of 114 bp fragment of interested in pork mitochondrial DNA

Step	Temperature	Time	Number
Holding stage	95	30s	1
Cycling stage	Denaturation at 95℃ for 5s and	5s	45
	elongation and extension in 62℃	34s	

۲-٤- تکثیر DNA در نمونه‌های استخراج شده توسط PCR معمولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ترموسایکلر PeqLab انجام شد. دناتوراسیون اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و ٤۰ سیکل با دناتوراسیون ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه اتصال در ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش[10] در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و مرحله افزایش طول[11] نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. تکثیر قطعه مطلوب DNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس 2X یکتا تجهیز (ایران)، ۱/۵ میکرولیتر از پرایمرهای F و R صورت گرفت. با توجه به غلظت پایین DNA نمونه‌های استخراج شده نسبت به DNA نمونه‌های گوشت در نتیجه فرایند تولید ژلاتین، مخلوط PCR برای نمونه‌های ژلاتین بدون اضافه نمودن آب مقطر و در نمونه‌های DNA استخراج شده در گوشت با غلظت ۱۰۰ نانوگرم صورت گرفت. جهت مشاهده محصول PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در هر چاهک ژل آگاروز ۲٪ در ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید.

۲-۵- تکثیر DNA به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی

تکثیر DNA استخراج شده از نمونه‌های بافتی و غذایی توسط کپ‌های نوری۰/۲ میلی‌لیتری MicroAmp و در دستگاه Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر متشکل از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس 2X سایبرگرین Takara Bio (ژاپن)، ۰/٤ میکرولیتر از رنگ مرجع Rox، ۰/۸ میکرولیتر از پرایمر با غلظت ۵ نانومول بر میکرولیتر، ۲ میکرولیتر از نمونه‌های DNA استخراج شده از گوشت و ٤ میکرولیتر از نمونه‌های غذاهای فرآوری شده مانند ژلاتین و باقیمانده تا حجم بیست میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. جهت بهینه کردن شرایط واکنش و کمینه کردن تشکیل پرایمر دایمر و حداکثر میزان تکثیر (حداقل Ct) از غلظت‌های مختلف پرایمر و دماهای مختلف در حالتFast مورد آزمون قرار گرفتند تا شرایط مندرج در جدول ۲ جهت انجام آزمون انتخاب گردید.

۲-٦- ارزیابی گزینش‌پذیری[12] و حساسیت[13]

برای ارزیابی حد تشخیص و کارایی روش PCR زمان واقعی، سری رقت‌های ۰/۱ تهیه شده از DNA استخراج شده از خوک مورد استفاده قرار گرفت. پس از آنالیز سری رقت‌های تهیه شده همان طور که در شکل ٤ نشان داده شده است، با توجه به این که

10. Extension
11. Final Elongation
12. Selectivity
13. Sensitivity

غلظت اولیه DNA در اولین تیوب برابر با ۸ نانوگرم در میکرولیتر بود، غلظت نهایی قابل تشخیص توسط روش ۸ پیکوگرم در میکرولیتر تعیین گردید. با رسم مقادیر Ct[14] در برابر غلظت اولیه DNA در محدوده ۸ نانوگرم بر میکرولیتر تا ۸ پیکوگرم در میکرولیتر، کارایی[15] ۹۲٪ حاصل شد. شیب منحنی استاندارد ۳/۵۳- و عرض از مبدا ۱۶/۷۹۳ بدست آمد.

جهت بررسی اختصاصی بودن روش از DNA استخراج شده از گونه‌های حیوانی گوسفند، گاو، مرغ و ماهی به عنوان کنترل منفی استفاد شد که همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص است، در این روش منحنی تکثیر در هیچ کدام از نمونه‌های کنترل منفی در شرایط بهینه شده فرایند، مشاهده نشد. دو منحنی تکثیر موجود در گراف تکثیر DNA خوک و یک نمونه ژلاتین خوکی را نشان می‌دهد که مقیاسی جهت مقایسه میزان تخریب DNA در نمونه های گوشت تازه و ژلاتین می‌باشد. همچنین منحنی ذوب شکل ۲ نشان دهنده منحنی عدم اتصال همین نمونه ها است که در مورد محصول PCR مورد نظر در دمای ۷۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

تیمارهای حرارتی بکار رفته در تولید ژلاتین باعث می‌شود تا این محصول در رده محصولاتی قرار گیرد که میزان زیادی تخریب در DNA به وجود می‌آید. از این رو پیش نیاز ضروری جهت شناسایی ماده ژلاتین در PCR وجود پرایمرهایی با کارایی بالا در شناسایی گونه و استخراج مقدار کافی از DNA الگو از مواد بسیار فرایند شده می‌باشد [۱۱].

در تکثیر DNA استخراج شده از نمونه‌های گوشت و نمونه‌های حاول ژلاتین با وجود اینکه اختصاصی بودن پرایمرها اثبات گردید (تصاویر نشان داده نشده‌اند) اما به علت فقدان حساسیت، ژل آگارز در برخی از نمونه‌های تجاری ژلاتین هیچ باندی را نشان نداد (شکل ۱).

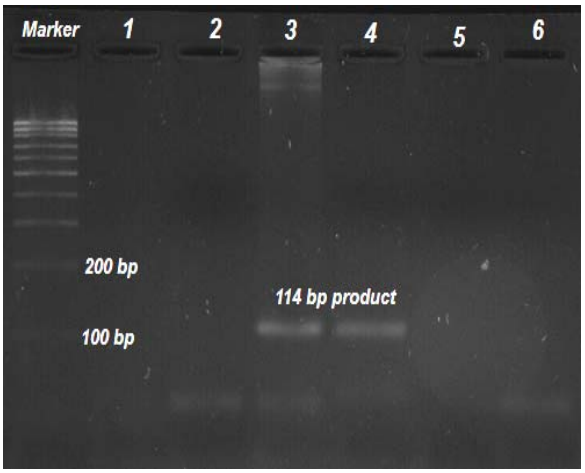

Fig 1 of PCR product of gelatin samples on 2% agarose gel

استفاده از توالی‌های هدف چند نسخه‌ای مانند ژن‌های میتوکندریایی و توالی‌های کوتاه DNA در مورد غذاهای بسیار فرآوری‌شده که در آن DNA تخریب شده است، بسیار توصیه گردیده است، زیرا امکان تکثیر DNA را در مقایسه با اهداف DNA منفرد یا با تعداد کپی‌های کم افزایش می‌دهد [۱۲]. حدود ۲ تا ۱۰ کپی از ژنوم میتوکندری درساختار نوکلئویدها[16] سازمان یافته است که سبب تعداد بالای نسخه‌های DNA میتوکندری در هر سلول در مقایسه با وجود تنها یک کپی از DNA هسته در هسته سلول می‌شود [۱۳و ۱٤]. شکل حلقوی DNA میتوکندری، به علاوه، عاری از پروتئین بودن آن در مقایسه با DNA خطی طویل دو رشته‌ای هسته که در ساختار کروموزم دور پروتئین‌های هیستون پیچیده شده است، سبب پایداری بیشتر و حساسیت کمتر به تخریب می‌شود [**Error! Bookmark not defined.**].

PCR زمان واقعی، فرایند اتومات شده‌ای است که نیاز به آنالیز پس از PCR را حذف کرده و بر اساس شدت فلورسانس محصولات PCR، توسط یک رنگدانه یا پروب، اندازه‌گیری کمّی انجام می‌گیرد. محصولات PCR یا آمپلیکون‌های کوتاه حدود ۱۵۰ bp یا کوتاهتر برای تکثیر توسط این روش مناسب هستند. حدود تشخیص PCR زمان واقعی، متغیر است اما اغلب در تشخیص تقلبات یا مقادیر ناچیز که بصورت بالقوه می‌توانند

14. Cycle of threshold
15. Efficiency
16. Nocleoids

مضر باشند کفایت می‌کند [۱۵]. معمول‌ترین دتکتور مورد استفاده در PCR زمان واقعی، رنگ سایبرگرین است که با اتصال غیراختصاصی به شیار کوچک[۱۷] DNAهای دو رشته‌ای در مخلوط واکنش، فلورسانس نشر می‌کند. استفاده از رنگ جای‌گیرنده[۱۸] در تشخیص گونه، ابزاری انعطاف‌پذیر و بدون نیاز به طراحی و بهینه‌سازی پیچیده پروب را ارائه می‌دهد. این رنگ به علت ارزان‌تر بودن از پروب، هزینه نهایی آنالیز را کاهش می‌دهد [۱۶].

یکی از اهداف این مطالعه توسعه یک نشانگر[۱۹] واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تشخیص سریع مشتقات خوکی بود. آمپلیکون‌های کوتاه در مقایسه با انواع بلند دارای مزیت‌هایی هستند. ۱-کمتر تحت تاثیر تخریب قرار گرفته و اطمینان بیشتری از بازیابی هدف در نمونه‌های آسیب دیده حاصل می‌گردد.۲- با کارایی بیشتری تکثیر می‌شوند و ۳- در الکتروفورز مویین آسانتر جداسازی می شوند [۱۷].

بنابراین در این مطالعه پرایمرها به نحوی طراحی شدند که یک توالی کوتاه از ناحیه D-loop خوک در ژنوم میتوکندری با تعداد نسخه‌های بالا را هدف بگیرد. به علاوه، نظر به حد تشخیص مطلوب‌تر روش Real-time PCR در مقایسه با توان تشخیص پس از PCR[20] روی ژل آگارز از این روش با استفاده از رنگ سایبرگرین استفاده شد که تلفیقی از حساسیت بالاتر به نسبت PCR معمولی و هزینه پایین‌تر در قیاس با طراحی پروب را دارا می‌باشد. ناحیه D-loop در چندین مطالعه برای طراحی پرایمر تشخیص گونه استفاده شده که توان خود برای تشخیص گونه در غذاهای فرایند شده را نشان داده است. کیم و همکاران (۲۰۱۶) از روش TaqMan Real -time PCR با استفاده از ناحیه D-loop میتوکندری توانستند به تشخیص ۰/۱٪ گوشت خوک در مخلوط‌های گوشت گاو و مرغ، بدون واکنش‌پذیری متقاطع[۲۱] دست یابند [۱۸].

در مطالعه دیگر کاراباساناوار و همکاران (۲۰۱٤) با استفاده از آمپلیکونی ۷۱۲ جفت‌بازی از همین ناحیه موفق به تشخیص گونه خوک در میان ۲٤گونه حیوانی در گوشت‌های خام، پخته شده، اتوکلاو شده و میکروویو شده خوک در حد ۰/۱٪ گردیدند [۱۹]. اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده علاوه بر بررسی‌های بیوانفورماتیک از جمله آنالیز NSBI BLAST و clustalw2 توسط نمونه‌های کنترل منفی استخراج شده از گاو، مرغ، ماهی و گوسفند در تکثیر با پرایمرهای پیشنهاد شده تایید گردید و پرایمرهای مورد آزمایش تنها قطعه‌ای ۱۱٤ جفت بازی را در DNA استخراج شده از خوک تکثیر کرده و در DNA استخراج شده از سایر گونه‌ها تکثیر مشاهده نشد. در شکل های ۲ و ۳ منحنی های ذوب و تکثیر نمونه های DNA استخراج شده از خوک، ژلاتین خوکی و گوشت گاو و مرغ و ماهی و گوسفند مشاهده می‌شوند.

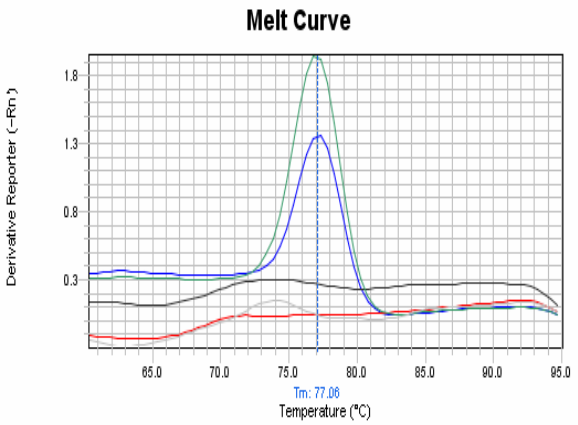

Fig 2 Melt curve plot of extracted DNA from pork, chicken, fish and sheep meats and one of food grade pork gelatin samples

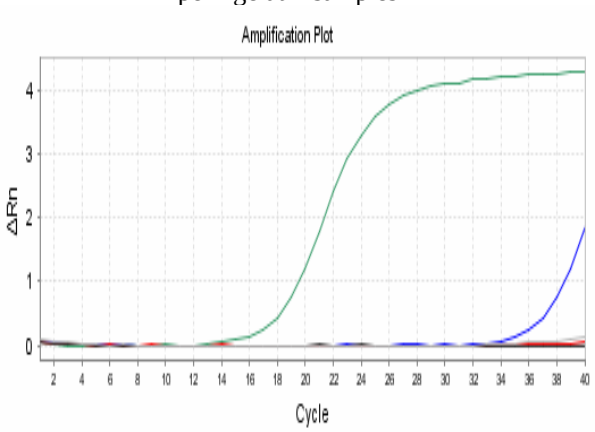

Fig 3 Amplification plot of extracted DNA from pork, chicken, fish and sheep meats and on of pork gelatin samples

17. Minor Groove
18. Intercalating
19. Marker
20. Post-PCR Detection
21. Cross-reactivity

سری رقت‌های ۱۰ برابری DNA معمولا جهت ایجاد منحنی استاندارد استفاده می شود تا حد تشخیص ۲۲ و کارایی سیستم PCR تعیین گردد [۲۰]. حد تشخیص این روش با استفاده از سری رقت‌های تهیه شده از DNA خوک، ۸ پیکوگرم در میکرولیتر بدست آمد وکارایی سیستم PCR در منحنی استاندارد ۹۲/۰۰۸٪ بود. ۱۵ نمونه تجاری غذایی شامل ۸ نمونه پودر و ورقه‌های ژلاتین خوک و ۷ نمونه پاستیل، مارشمالو و ژله آماده مصرف از تولید کننده‌های مختلف در دو روز مختلف از دو شعبه مختلف فروشگاه تهیه شد که روی برچسب آنها "ژلاتین خوک" درج شده بود. این نمونه ها به عنوان محصولات بسیار فرایند شده برای ارزیابی تست مورد استفاده قرار گرفتند که روش در تشخیص تمام نمونه‌های پودر و ورق ژلاتین موفق بود اما از میان ۷ نمونه محصولات حاوی ژلاتین شامل ۲ نمونه مارشمالو، ۳ نمونه پاستیل و۲ نمونه ژله آماده مصرف تهیه شده از ژلاتین خوکی روش موفق به تشخیص DNA خوک در نمونه ژله آماده مصرف نگردید.

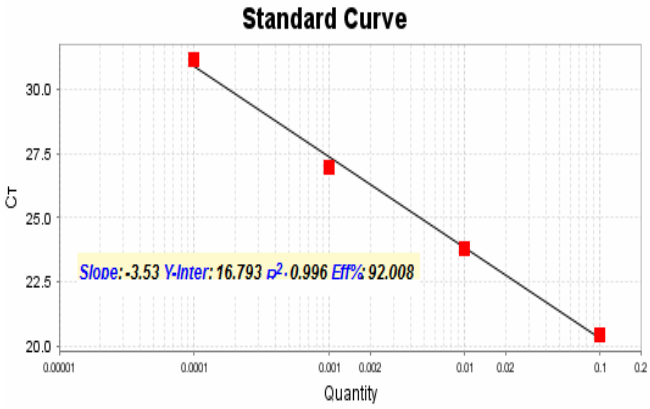

Fig 4 Standard curve for amplified serially ten folded diluted DNA extracted from pork with designed primer in D-loop region of pork. With the slope of -3.53 and intercept=16.793 and efficiency=%92.008

مراحل متعددی همچون هیدرولیز اسیدی و قلیایی بافت پیوندی ماده اولیه، دمای بالا و استخراج تحت فشار توسط آب، استریل کردن و خشک کردن در تهیه ژلاتین بکار می‌روند. این فرایندها در تهیه انواع ژلاتین یکسان و یکنواخت نیستند که خواص محصول نهایی ژلاتین را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در نتیجه امکان وجود پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک بسیار تخریب شده در محصول نهایی ژلاتین، با تنوع زیاد وجود دارد و کم بودن مقادیر و متغیربودن آنها نیز بر مشکل اندازه‌گیری‌ها می‌افزاید [**Error! Bookmark not defined.**]. نمونه‌های ژلاتین غذایی از برندهای مختلف با توجه به شدت و ضعف فرایند اعمال شده روی آنها و در نتیجه میزان متفاوت از تخریب DNA، مقادیر Ct متفاوتی داشتند. در شکل ۵ نمودار تکثیر نمونه‌های ژلاتین و محصولات تجاری حاوی ژلاتین نشان داده شده است. علاوه بر تخریب DNA، اجزای ماده غذایی که به همراه اسید نوکلئیک استخراج می‌شوند، می‌توانند منجر به نتایج منفی غلط شوند که احتمالا به علت جلوگیری از فعالیت DNAپلیمراز است [۲۱] که این موضوع در یکی ازنمونه‌ها یعنی مورد ژله آماده مصرف با طعم پرتقال مشاهده شد (شکل ۵).

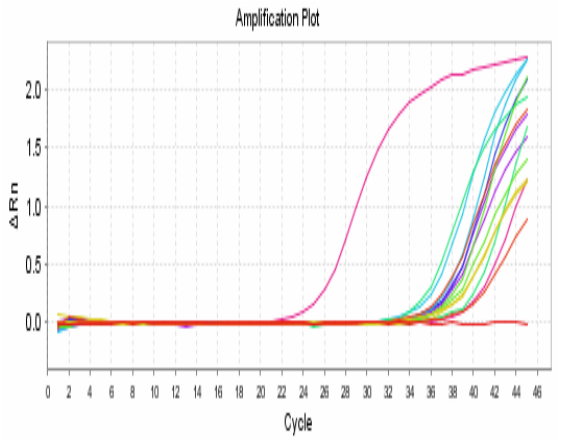

Fig 5 Amplification plot of 15 various food grade pork gelatin and gelatin containing foods. Non amplified plot related with drinking jelly sample

همچنین جهت افزایش مقدار DNA قابل تکثیر و کاهش مواد بازدارنده از کیت ستونی تجاری استخراج DNA استفاده شد که در مقایسه با کیت استخراج DNA بر مبنای محلول گوانیدین، مقادیر نسبت $\frac{A260}{A280}$ (که بیانگر خلوص DNA استخراجی است) مناسب‌تری را ارائه دادند (نتایج آورده نشده‌اند).

٤- نتیجه‌گیری

نتایج آزمایشات انجام شده در این مطالعه نشان داد که با استفاده از کیت تجاری استخراج DNA و استفاده از روش Real-time

22. Detection limit (DL)

PCR با رنگ عمومی سایبرگرین می‌توان وجود DNA خوک در انواع گوشت و غذاهای بسیار فراوری شده همچون ژلاتین که سطح بسیار بالایی از تیمارهای حرارت و pH را گذرانده‌اند را تشخیص داد. با توجه به اینکه شدت فراوری در بسیاری از فراورده‌های گوشتی به مراتب از تولید ژلاتین کمتر است، این روش می‌تواند به عنوان یک روش مناسبی است که مشکل عدم توان تشخیص در نمونه‌های با DNA تخریب شده بر روی ژل آگارز در PCR معمولی را ندارد و همچنین مسئله هزینه بسیار زیاد طراحی پروب در آن وجود ندارد که می‌تواند در تشخیص مشتقات خوکی در فراورد های غذایی مورد توجه قرار گیرد.

۵- سپاسگزاری

از همکاری بی‌دریغ بخش پزشکی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انیستیتو پاستور ایران در مسیر انجام این تحقیق قدردانی و تشکر می‌گردد.

٦- منابع

[1] Mustafa T. Y. , Zulal K. , Betul B. , Osman S. , Oktay K. , Omer K. , Hasan Y. , Ahmet T. B. , 2013, A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MSE based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin- Food Chemistry, 141,2450–2458.

[2] Jones, N.R., 1977. Uses of gelatin in edible products. In: Ward, A.G., Courts, A. (Eds.), The Science and Technology of Gelatin. Academic Press, London, UK, pp. 366–392.

[3] Jones, B.E., 2004. The history of the medicinal capsule. In: Podczeck, F., Jones, B.E. (Eds.), Pharmaceutical Capsules. Pharmaceutical Press, Grayslake, IL, USA,. 1–22.

[4] Boran, G. Regenstein, G.m , 2010, chapter 5, fish gelatin. Advances in food nutrition research, 60, 119-143

[5] Aida, A. A., Che Man, Y. B., Wong, C. M. V. L., Raha, A. R., & Son, R., 2005. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for halal authentication. Meat Science, 69, 47-52.

[6] Rodríguez, M. A., García, T., Gonzalez, I., Hern andez, P. E., & Martín, R. ,2005, TaqMan real-time PCR for the detection and quantification of pork in meat mixtures. Meat Science, 70, 113-120.

[7] Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J.L., Demeulemester, C., 2004. Species identification of meat products by ELISA. International Journal of Food Science & Technology 39, 863–867.

[8] Chou, C.C., Lin, S.P., Lee, K.M., Hsu, C.T., Vickroy, T.W., Zen, J.M., 2007. Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences, 230-239.

[9] von Bargen, C., Dojahn, J., Waidelich, D., Humpf, H.-U., & Brockmeyer, J. 2013. New sensitive high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in Halal beef. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 11986-11994.

[10] Fumiere, O., Dubois, M., Baeten, V., von Holst, C., Berben, G., 2006. Effective P detection of animal species in highly processed animal byproducts and com pound feeds. Analytical and Bioanalytical Chemistry 385, 1045–1054.

[11] Shabani, H., Mehdizadeh, M., Mousavi, S. M., Dezfouli, E. A., Solgi, T., Khodaverdi, M., Rabiei, M., Rastegar, H., & Alebouyeh, M. 2015. Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. Food Chemistry, 184, 203-206.

[12] Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Shivakumar, B. M., Anand, M., Patel, M., et al. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. Meat Science, 70, 107–112.

[13] Gefrides, L., & Welch, K. 2011. Forensic biology: Serology and DNA. In A. Mozayani, & C. Noziglia (Eds.), The forensic laboratory handbook procedures and practice (pp. 16–49). (2nd ed.). London: Humana ress.

[14] Bogenhagen, D. F. 2009. Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal

Cells. In J. A. Stuart (Ed.), Mitochondrial DNA: Methods and protocols (pp. 3–14). (2nd ed.). New York: Humana Press.

[15] Lenstra, J. A. 2010. Detection of adulterations: Identification of animal species. *In*: L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), Safety Analysis of Foods of Animal Origin (pp. 601–617). Boca Raton, FL: CRC Press.

[16] Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., et al. 2008. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (Cervus elaphus), fallow deer (Dama dama), and roe deer (Capreolus capreolus) in meat mixtures. Meat Science, 79, 289–298.

[17] Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., Che Man, Y.B., Dhahi, TH S., Kashif M.2012. Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. Meat Science, 91, 454–459.

[18] Kim M, Yoo I, Lee SY, Hong Y, Kim HY.2016.Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. 210:102-106..

[19] Karabasanavar N, S, Singh S .P, Kumar D, Shebannavar S N, 2014, Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop.,Food Chemistry;145:530-534.

[20] Yusop, M. H. M., Mustafa, S., Che Man, Y. B., Omar, A. R., & Moktar, N. F. K. .2011, Detection of raw pork targeting mitochondrial cytochrome b gene by molecular beacon probe real-time polymerase chain reaction. Food Analytical Methods, 5, 422-429.

[21] Laube, A. Spiegelberg, A. Butschke,J. Zagon, M. Schauzu, L. Kroh, H. Broll, 2003, Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction, international journal of food science and technology, 38: 2 , 111–118.

Detection of pork derivatives in meats and suspicious highly processed foods by Real-time PCR

Maleki, E. [1], Ghorbani, M. [2*], Hamid, M. [3], Sadeghi Mahounak, A. R. [2], Khomeiri, M. [2]

1. Ph.D Student of Food Chemistry, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Faculty of Agriculture, Dept. of Food Science and Technology
2. Associate Professor of Food Science and Technology University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Faculty of Agriculture, Dept. of Food Science and Technology
3. Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center Pasteur Institute of Iran

(Received: 2016/12/07 Accepted:2017/07/24)

Detection of the residual meat or other components of pork in halal food products particularly in Muslim countries is of prime importance. In this study, real-time polymerase chain reaction based on SyberGreen dye was used for detection of pork DNA in meats and highly processed products such as pork gelatin and gelatin-containing products. SyberGreen based real-time polymerase chain reaction was designed for an assay that can detect pork DNA in meats and highly processed pork derivatives including gelatin and gelatin containing products. The proposed method uses the newly specific primers designed by AlleleID7 software that amplify a 114 bp fragment of porcine mitochondrial D-loop region. After optimization of mixture composition and thermal program for achieving maximum fluorescence and minimum threshold cycle, standard curve of serially diluted DNA extracted from pork meat showed power for detection of 0.001 diluted DNA compared with starting DNA material with the efficiency of 92%. Specificity of this method was evaluated by testing the extracted DNA from sheep, cow, chicken and fish which had no amplification for negative control samples. To analyze the method for detecting highly processed pork derivatives, several pork gelatin powders and sheets were selected and the real-time polymerase chain reaction based on SyberGreen dye proved to successfully detect the traces of the pork residues in the samples tested.

Keywords: Halal foods, Pork, Detection, Gelatin, Real-time PCR

* Corresponding Author E-Mail Address: moghorbani@yahoo.com