استخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR) في الكشف عن غش لحوم الأغنام

رغداء أصلان[1] ونعيم الحسين[2] وفاتح خطيب[3] ومصطفى اسعيد[4] وأسماء معاز *[1]

(1). قسم التقانات الحيوية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، حلب، سورية.
(2). مركز بحوث حلب، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
(3). قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية.
(4). قسم تكنولوجيا الأغذية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، حلب، سورية.
(*للمراسلة: أسماء معاز. البريد الإلكتروني: asmaa.990@hotmail.com).

تاريخ الاستلام: 2017/09/16 تاريخ القبول: 2017/10/24

الملخص

يعاني المستهلك وبشكل خاص في الدول الفقيرة من أنواع عديدة من عمليات غش اللحوم من خلال خلطها بأنواع أخرى أرخص ثمناً وأقل قيمة من الناحية الغذائية. يتم عادةً تطبيق التحاليل الشكلية التقليدية أو المعتمدة على تحليل المكونات من أجل تمييز اللحوم غير المصرح بها إلا أن هذه الطرائق تعطي غالباً نتائج غير صحيحة أو غير موثوقة ولذلك كان موضوع إيجاد طرائق أكثر دقة وموثوقية أمر بالغ الأهمية في تمييز الأطعمة. تُعد التقنيات المعتمدة على الـ DNA ذات انتشار كبير في هذا المجال وذلك بسبب حساسيتها وسرعتها ودقتها العالية. تم في هذه الدراسة استخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز المتخصص بالأنواع Species specific PCR في تحليل 18 عينة لحم غنم مفرومة للكشف عن غشها بلحوم البقر أو المعز أو الدجاج أو الديك رومي أو الخنزير. تم الاعتماد في عملية الكشف على بادئات متخصصة تستهدف بشكل نوعي المورثة المشفرة للبروتين سيتوكروم b. بينت نتائج هذه الدراسة أن جميع العينات المدروسة كانت مغشوشة، بواحد أو أكثر من اللحوم، إذ أمكن الحصول على القطعة المتوقعة من كل زوج من البادئات المستخدمة الأخرى. وكان الغش بلحم المعز هو الأكثر تردداً إذ بلغ 94.44 %، بينما كانت نسبة الغش بالديك الرومي الأقل تردداً وكانت 16.67%، ولم تسجل أي عملية غش بلحم الخنزير.

الكلمات المفتاحية: التفاعل السلسلي للبوليميراز، غش اللحوم، مورثة سيتوكروم b.

المقدمة:

تشكل اللحوم لا سيما الحمراء منها أحد أهم مصادر البروتينات الحيوانية الضرورية للإنسان في العالم (Ran *et al.*, 2015) وخصوصاً في منطقة شرق المتوسط (Andrée *et al.*, 2007). وهي مصدر ممتاز للدهون والعناصر المعدنية وبعض الفيتامينات، وتتمتع بطعم مستساغ بعد طهيها (Mahajan *et al.*, 2011). ولكنّ ارتفاع أسعار الأعلاف وقلة المراعي أدى إلى انخفاض إنتاجها، الأمر الذي أدى بدوره إلى لجوء بعض العاملين في مجال إنتاج اللحوم وتصنيعها إلى اللجوء إلى عملية

غش اللحوم، وباتت هذه الظاهرة في الآونة الأخيرة مشكلة كبيرة في العديد من البلدان وخاصة البلدان العربية، مما جعل لطرق تحديد أنواع اللحوم أهمية كبيرة في السلامة الغذائية (Singh and Sachan, 2009).

تتمثل الحالات التقليدية لعملية غش اللحوم إما في خلط نوع محدد من اللحوم مع لحوم مصدرها حيوانات أخرى تكون أقل سعراً أو أقل قيمةً غذائية دون الإعلان عن ذلك بشكل صريح وواضح (Bai *et al.*, 2009). أو عن طريق خلطها مع لحوم السواقط في حال اللحم المفروم (Girish *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2006) أو إضافة بروتينات حيوانية (تكون عادةً أرخص ثمناً) أو بروتينات نباتية (كفول الصويا والمشتقات الحبوبية) في حالة منتجات اللحوم المصنعة (Cawthorn *et al.*, 2013; Lees, 2003). قد يكون وجود الأنواع غير المصرح بها غير متعمد نتيجة الجهل أو التلوث غير المقصود (Cawthorn *et al.*, 2013). ومع ذلك يُعد هذا الأمر مخالفاً لثقافة المواطن ومعتقداته (Kang'ehte *et al.*, 1986). كما يجدر الإشارة إلى وجود أشخاص لديهم معتقدات دينية تجاه تناول بعض أنواع اللحوم إذ أن مثل هؤلاء الأفراد يهتمون جداً بالعلامات التجارية الموثوقة (Ballin *et al.*, 2009). على سبيل المثال لا يتناول الشعب الهندوسي لحم البقر أما المسلمون واليهود فلا يتناولون لحم الخنزير ولو حتى بكميات قليلة، كما أن بعض المستهلكين يفضلون لحوم الدواجن كحمية غذائية بدلاً من لحوم الأبقار والخنازير والأغنام (Weder *et al.*, 2001).

ولذلك تُعد القدرة على كشف مختلف أنواع اللحوم المستخدمة في الخلط التجاري أمراً بالغ الأهمية ليس فقط لأسباب اقتصادية أو صحية أو دينية أو أخلاقية بل أيضاً من أجل الحفاظ على العلاقات التجارية والقوانين الدولية (Nakyinsige *et al.*, 2012) بالإضافة إلى حماية رغبات المستهلك (Singh *et al.*, 2007).

طُورت العديد من الطرائق لكشف وتحديد نوع أو أنواع اللحوم المفرومة الناعمة المستخدمة لإنتاج مصنعات اللحوم كالمرتديلا والنقانق وغيرهم. وتطورت من بسيطة تعتمد على الصفات الشكلية والفيزيائية كاللون والرائحة والمتانة إلى تقنيات عالية الكفاءة تعتمد على تحليل المادة الوراثية (Singh and Neelam, 2011).

تُستخدم الطرائق المعتمدة على دراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية للبروتينات المميزة لكل نوع من اللحوم على نطاق واسع في تحديد الخلط المتعمد أو غير المتعمد للحوم (Van Raamsdonk *et al.*, 2007)، والتي تتضمن الرحلان الكهربائي والرحلان الكهربائي المعتمد على نقطة التعادل الكهربائي للبروتينات وكذلك الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء والطرائق المناعية الكيميائية مثل طريقة الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم ELISA (Volk *et al.*, 2014). ولكن يعاب على هذه التقنيات عدم قدرتها على الكشف الدقيق عن اللحوم المضافة بكميات قليلة نسبياً وارتفاع تكلفتها وكونها تتطلب وقتاً وجهداً كبيرين (Ballin, 2010). كما يحتمل حدوث تفاعلات مشتركة مع المصل المضاد المستخدم من خلال ارتباط نوعين أو أكثر من البروتينات مع الجسم المضاد نفسه، بالإضافة إلى إمكانية تغير الخصائص التنافسية بين البروتين الهدف والمصل المضاد له عند تحضير وطهي اللحوم ومنتجاتها (Van Raamsdonk *et al.*, 2007).

في السنوات القليلة الماضية أصبح الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA أداة تم الاعتماد عليها لتمييز أنواع اللحوم إذ يتواجد الـ DNA في معظم أنواع الخلايا (Ballin, 2010; Lenstra, 2003). ولذلك فإنه من الممكن الحصول على معلومات متطابقة باستخدام عينات مختلفة من نفس المصدر وذلك بغض النظر عن أصل النسيج (Kumari, 2007). أدى ذلك مؤخراً إلى توظيف التقنيات الجزيئية المعتمدة على خصائص وصفات الـ DNA في تحليل ودراسة المنتجات الحيوانية المختلفة. تتميز هذه التقنيات على اختلافها بالدقة والحساسية والانتقائية العالية وبسرعة إجرائها، وتسمح بالكشف عن أكثر من نوع واحد من اللحوم في

تفاعل واحد فقط ليس في الأغذية الطازجة أو المجمدة فحسب بل أيضاً في المنتجات المعالجة والمطبوخة والفاسدة والمخلوطة (Ballin, 2010; Singh and Neelam, 2011).

هناك عدد من تقنيات الـ DNA المختلفة والتي تتضمن طرائق التهجين والتقنيات المعتمدة على التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR (Lees, 2003). تبلغ الحدود الدنيا للكشف في تقنيات التهجين حوالي 1 – 5% وهي غير قادرة على التمييز بين الأنواع المتقاربة من بعضها البعض مثل الغنم والمعز والأنواع المختلفة من الأبقار وكذلك أنواع الغزلان (Lees, 2003). بينما نجد أن التقنيات المعتمدة على التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR تستحق اهتماماً خاصاً وذلك لأنها عالية الحساسية والنوعية بالإضافة إلى أنها تحتاج وقتاً قصيراً نسبياً لإنجازها (Yosef *et al.*, 2014). ولذلك فقد حظيت مثل هذه التقنيات مؤخراً باهتمام كبير لكونها قادرة على مكاثرة تسلسل محدد مستهدف يتواجد بعدد قليل من النسخ حتى التوصل إلى عدد كبير منه يسهل الكشف عنه حتى في مزائج معقدة من التسلسلات الجينومية (Eaqub Ali *et al.*, 2012). كما تكون حدود الكشف الدنيا غالباً أقل من القيم الملاحظة في التقنيات المعتمدة على البروتين (Ballin *et al.*, 2009). أدت هذه الأسباب وغيرها إلى اعتبار طريقة الـ PCR طريقة واعدة في تحديد الغش بين الأنواع (Kumari, 2007).

تُعد تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR باستخدام بادئات متخصصة (Species–Specific PCR) من أهم التقنيات المستخدمة في تمييز أنواع اللحوم المفرومة والمصنعة (Eaqub Ali *et al.*, 2015)، بالإضافة إلى ذلك فإنه من الممكن القيام بتفاعل PCR متعدد multiplex PCR وذلك من خلال دمج العديد من البادئات المتخصصة بالأنواع في أنبوب واحد لمكاثرة التسلسلات المستهدفة مما يؤدي إلى تخفيض الوقت اللازم والمواد والتكلفة (Hellberg and Morrissey, 2011). كما أن أحد أهم مزايا طريقة الـ PCR المتعدد هو عدم الحاجة إلى استخدام أنزيمات تقطيع حصرية كما هو الحال في تقانة قطعة الحصر ذات التكوين والطول المتعدد RFLP من أجل تمييز نمط الترحيل الكهربائي المحدد على هلام الأغاروز (Zarringhabaie *et al.*, 2011).

لقد استهدف العديد من الباحثين العناصر النووية المنتشرة Interspersed Nuclear Elements (SINE) في الجينوم من أجل تمييز أنواع اللحوم، كما تم الاعتماد على مورثات تنتمي إلى عائلة الأكتين Actin family ومورثات التوابع Satellite genes في تمييز أنواع اللحوم (Gowda, 2013). وعموماً تُعد الطرائق المعتمدة على استخدام بادئات متخصصة بمورثات المصورات الحيوية (الميتوكوندريا) mitochondrial genes أكثر ملاءمة للأنواع الغريبة وخاصة في حال عدم وجود معلومات مسبقة عن أصل الأنواع المشتبه بها (Janssen *et al.*, 1998). يتميز الـ DNA الميتوكوندري بعدد من المميزات المهمة مقارنة مع الـ DNA الجينومي النووي والتي تسهل المكاثرة بواسطة الـ PCR. ويرجع السبب إلى تواجد عدد كبير من النسخ بالمقارنة مع الـ DNA الجينومي النووي من جهة (Gowda, 2013)، ومعدل طفرات أعلى في المورثات الميتوكوندرية مما يسهل من عملية التمييز حتى بين الأنواع شديدة القرابة. وبشكل عام، يُعد هذان السببان من بين أهم الأسباب التي تجعل من الـ DNA الميتوكوندري هدفاً جزيئياً ملائماً للتمييز حتى بين الأنواع شديدة القرابة (Kesmen *et al.*, 2012).

تُعد المورثة الميتوكوندرية المشفرة للبروتين سيتوكروم b (Cyt b) شائعة الاستخدام وذلك لأنها ملائمة لتمييز الأنواع بسبب التنوع النكليوتيدي لها بين الأنواع بالإضافة إلى توافر تسلسل نكليوتيداتها ضمن قواعد البيانات المرجعية (Imaizumi *et al.*, 2007). ووفقاً للعديد من الدراسات المرجعية القديمة والحديثة تُعد المورثة سيتوكروم b من بين المورثات الأكثر تناولاً في الدراسات التي تهتم بتطور الكائنات الحية وتعريفها على المستوى الجزيئي (Gowda, 2013).

نظراً لندرة الدراسات المتعلقة بكشف الغش، تهدف هذه الدراسة إلى الكشف عن خلط بعض عينات لحوم الغنم المفرومة في مدينة حلب بأنواع أخرى وذلك بالاعتماد على تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز باستخدام بادئات متخصصة Species-Specific PCR.

مواد البحث وطرائقه:

نُفذ هذا البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- مركز بحوث حلب وذلك خلال الفترة الممتدة بين 2016- 2017.

1. العينات المستخدمة:

جُمعت 18 عينة لحم غنم مفروم بشكل عشوائي من الأسواق المحلية ثم نقلت إلى المختبر تحت ظروف التبريد لمعالجتها بشكل فوري أو تخزينها عند درجة 20-°س حتى الاستخدام.

2. استخلاص المادة الوراثية DNA:

أُستخلصت المادة الوراثية من عينات لحم الغنم المفرومة والتي يبلغ عددها 18 عينة وفقاً للطريقة المقترحة من قبل Aljanabi و Martinez (1997):

1. وُزنت كمية 0.2 غرام من كل عينة وتم نقلها إلى أنابيب نظيفة ومعقمة سعتها 2 مل.
2. أُضيف حجم مقداره 570 ميكرو ليتر من المحلول الموقي الحال للخلايا (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA, pH 8.0; 0.4M NaCl) إلى كل عينة مع المجانسة.
3. أُضيف 150 ميكرو ليتر من المحلول صوديوم دوديسيل سلفات SDS تركيز 10% ومن ثم 10 ميكروليتر من الأنزيم بروتيناز K تركيز 20 مغ/مل
4. حُضنت الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 65°س لمدة ساعة واحدة أُضيف 450 ميكرو ليتر من محلول كلوريد الصوديوم 4.5 مولر إلى كل عينة.
5. ثُفلت الأنابيب لمدة نصف ساعة عند سرعة 13200 دورة/دقيقة.
6. بعد نقل المحلول الطافي إلى أنابيب جديدة أُضيف حجم مساوي له من المزيج فينول/ كلوروفورم/ إيزو أميل الكحول (1/24/25) ثم قُلبت الأنابيب بلطف لمدة 30 ثانية.
7. ثُفلت الأنابيب لمدة عشر دقائق عند سرعة 13200 دورة/دقيقة ثم نُقلت الطبقة المائية إلى أنابيب جديدة.
8. كُررت عملية الغسل بمزيج الفينول/ كلوروفورم/إيزوأميل الكحول لمرة واحدة
9. سُحبت كمية 650 ميكرو ليتر من الطور المائي وأضيف له ضعف الحجم من الإيتانول المطلق البارد، ثم ثُفلت محتوياتها لمدة 15 دقيقة على سرعة 13200 دورة/دقيقة.
10. أُضيف إلى رسابة الـ DNA 1 مل من الإيتانول تركيز 70% ثم ثُفلت الأنابيب لمدة 5 دقائق عند سرعة 13200 دورة/دقيقة.
11. جُففت الرسابة ثم تم حل الـ DNA في 50 ميكروليتر من المحلول TE.

3. تقدير كمية ونوعية الـ DNA:

تم قياس تركيز محاليل الـ DNA المستخلص من جميع العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer من نوع Eppendorf AG Biophotometer 22331 Hamburg، كما حُددت نقاوة الـ DNA المستخلص بقياس الامتصاصية (OD) عند طولي موجة 260 و280 نانومتر وحسبت النسبة ($OD_{280}\backslash OD_{260}$). تُعد نوعية الـ DNA جيدة إذا تراوحت هذه النسبة في العينات النقية ما بين 1.8–2.0 (Sambrook and Russel, 2001). حُضرت العينات للقياس بأخذ 10 ميكرو ليتر من محلول الـ DNA المستخلص وإكمال الحجم إلى 200 ميكرو ليتر من المحلول TE. كما اختبرت نوعية الـ DNA وجودته من خلال الرحلان الكهربائي Electrophoresis في هلام أغاروز تركيز 1% وحُملت كمية 2 ميكروليتر من الـ DNA، أضيف لها 2 ميكروليتر محلول تحميل 10x loading dye ، و6 ميكروليتر من الماء المقطر والمعقم. تمت عملية الرحلان بتطبيق جهد كهربائي مقداره 100 فولت لمدة 45 دقيقة، ثم صُبغ الهلام في محلول بروميد الايثيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل، وظُهّرت الحزم تحت الأشعة فوق البنفسجية UV في جهاز توثيق الهلام gel documentation، ومن ثم أخذت صورة رقمية للهلام لتحليل النتائج.

4. التفاعل السلسلي للبوليميراز المتخصص بالأنواع Species specific PCR:

أُستخدمت ستة أزواج من البادئات المختلفة على عينات لحم الغنم المفروم والمتخصصة بالأنواع الآتية: الغنم والبقر والمعز والدجاج والخنزير والديك الرومي. استهدفت هذه البادئات مناطق محافظة ومتخصصة بالأنواع من مورثة السيتوكروم b الميتوكوندرية (الجدول 1) للحصول على قطع DNA ذات أطوال محددة بحيث يبلغ طولها 331 و274 و157 و268 و212 و262 زوج نكليوتيدي للغنم والبقر والمعز والدجاج والخنزير والديك الرومي على التوالي.

الجدول (1): البادئات المستخدمة والتسلسل النكليوتيدي الخاص بها

الحيوان	التسلسل 3'---5'	الاتجاه	درجة الالتحام	المرجع
عام (غنم، بقر، معز)	GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCT	أمامي	60ºس	Mašková and Paulíčková, 2006
غنم	CTA TGA ATG CTG TGG CTA TTG TCG CA	عكسي		
بقر	CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG	عكسي		
معز	CTCGACAAATGAGAGTTACAGAGGGA	عكسي		
دجاج	CGGTGGCTATGAGTGTGAGG	أمامي	60ºس	Herman, 2001
	AGCAGTCTGCCTCATG	عكسي		
خنزير	GCCTAAATCTCCCCTCAATGGTA	أمامي	58ºس	Ilhak and Arslan, 2007
	ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG	عكسي		
ديك رومي	TATGAGGGTGAGAAGTAA	أمامي	58ºس	Herman, 2001
	TAGCAGTATGCCTCATCACT	عكسي		

حُضر مزيج تفاعل البوليميراز المتعدد Multiplex–PCR باستخدام بادئات الغنم والبقر والمعز (الجدول 1) لأنها تشترك بالبادئة الأمامية ودرجة الالتحام وذلك بحجم نهائي 10 ميكروليتر بحيث يحتوي على: 2 ميكرو ليتر DNA (50 نانوغرام/ ميكرو ليتر)، 1 ميكرو ليتر من المحلول المنظم (10x PCR buffer)، 0.4 ميكرو ليتر من محلول كلوريد المغنيزيوم (تركيز 50 ميلي مولر)، 0.4 ميكرو ليتر من كل بادئة من البادئات الأربعة (التركيز الأساسي لكل منها 10 ميكرومولر)، 1 ميكرو ليتر من مزيج النيكليوتيدات الأربع dNTP's (تركيز 2 ميلي مولر) من شركة Euro clone، 0.3 ميكرو ليتر من أنزيم البلمرة الثابت حرارياً

من شركة Euro clone (تركيز 5 وحدة أنزيمية/ ميكرو ليتر) وأكمل الحجم إلى 10 ميكرو ليتر بإضافة الماء منزوع الشوارد المعقم.

كما أُجري أيضاً تفاعل مفرد لكل من بادئات الدجاج والخنزير والديك الرومي أيضاً في حجم نهائي للتفاعل مقداره 10 ميكرو ليتر، وحضر مزيج التفاعل للعينات المذكورة بإضافة كل من المكونات الآتية: 2 ميكرو ليتر DNA (50 نانوغرام/ ميكرو ليتر)، 1 ميكرو ليتر من المحلول المنظم (10x PCR buffer)، 0.4 ميكرو ليتر من محلول كلوريد المغنيزيوم (تركيز 50 ميلي مولر)، 0.5 ميكرو ليتر من كل بادئة عكسية وأمامية بالنسبة للدجاج والديك الرومي و0.4 ميكرو ليتر بالنسبة للخنزير (التركيز الأساسي لكل منها 10 ميكرومولر)، 1 ميكرو ليتر من مزيج النيكليوتيدات الأربع dNTP's (تركيز 2 ميلي مولر)، 0.3 ميكرو ليتر من أنزيم البلمرة (تركيز 5 وحدة أنزيمية/ ميكرو ليتر) وأكمل الحجم إلى 10 ميكرو ليتر بإضافة الماء منزوع الشوارد المعقم.

تمت عملية التدوير الحراري في جهاز من نوع Eppendorf Mastercycler Germany باستخدام ثلاثة برامج للتدوير الحراري، نُفذ البرنامج الأول (بادئات الغنم والبقر والمعز والدجاج) وفق الخطوات التالية: فصل أولي عند 94ºس لمدة 4 دقائق ولدورة واحدة، ومن ثم تبعها عملية فصل ثانوي عند 94ºس لمدة 30 ثانية، التحام البادئة عند الدرجة 60ºس لمدة 30 ثانية، الامتداد عند الدرجة 72ºس لمدة 45 ثانية، كررت المراحل الثلاث 35 دورة، ثم انتهى البرنامج بمرحلة امتداد نهائي عند الدرجة 72ºس لمدة 5 دقائق.

ونُفذ البرنامج الثاني (بادئات الديك الرومي) وفق المراحل التالية: فصل أولي عند 95ºس لمدة 4 دقائق ولدورة واحدة، ومن ثم تبعها عملية فصل ثانوي عند 95ºس لمدة 30 ثانية، التحام البادئة عند الدرجة 58ºس لمدة 30 ثانية، الامتداد عند الدرجة 72ºس لمدة 45 ثانية، كررت المراحل الثلاث 35 دورة، ثم انتهى البرنامج بمرحلة امتداد نهائي عند الدرجة 72ºس لمدة 8 دقائق.

أما البرنامج الثالث (بادئات الخنزير) فقد نُفذ وفق الخطوات التالية: فصل أولي عند 94ºس لمدة 4 دقائق ولدورة واحدة، ومن ثم تبعها عملية فصل ثانوي عند 94ºس لمدة 45 ثانية، التحام البادئة عند الدرجة 58ºس لمدة 45 ثانية، الامتداد عند الدرجة 72ºس لمدة 90 ثانية، كررت المراحل الثلاث 40 دورة، ثم انتهى البرنامج بمرحلة امتداد نهائي عند الدرجة 72ºس لمدة 5 دقائق.

5. الرحلان الكهربائي:

أُضيف لكل عينة كمية 1 ميكروليتر من محلول التحميل 10x loading dye، ثم فصلت نواتج التفاعل على هلام أغاروز تركيز 2% حُضرت باستخدام محلول TAE (1 X Tris–acetate buffer). تمت عملية الترحيل باستخدام نفس المحلول السابق لمدة 2– 2.30 ساعة، عند جهد كهربائي مقداره 100 فولط. بعد انتهاء عملية الترحيل صُبغ الهلام باستخدام محلول بروميد الإيثيديوم Ethidium Bromide تركيز 0.5 ميكرو غرام/ مل لمدة 30 دقيقة مع التحريك، ومن ثم غُسل الهلام بالماء المقطر للتخلص من بقايا مادة الصبغ. أُخذت صورة رقمية للهلام باستخدام جهاز توثيق الهلام من نوع Wise Doc المزود بمصدر للأشعة فوق البنفسجية UV لتحليل النتائج.

6. تحليل النتائج:

تم استخدام شاهد إيجابي وشاهد سلبي في جميع تفاعلات المكاثرة المنجزة، إذ تم استخلاص الـ DNA من عينات لحم موثوقة المصدر من الغنم والبقر والمعز والدجاج والديك الرومي والخنزير وذلك بغية استخدامه كشاهد إيجابي، بينما تم تحضير الشاهد السلبي باستخدام ماء مقطر ومعقم بدلاً من الـ DNA.

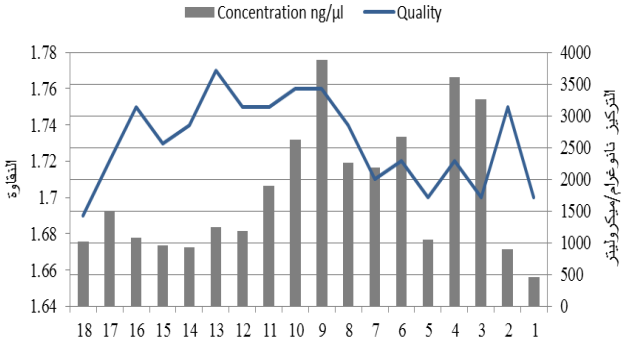
تم مقارنة حزم الـ DNA للعينات المدروسة بعد عملية الرحلان الكهربائي بعينات الشاهد الإيجابي والسلبي، وحُسبت النسبة المئوية لغش عينات الغنم وفق المعادلة:

% للغش = (عدد العينات الايجابية/ العدد الكلي للعينات المختبرة) × 100.

النتائج والمناقشة:

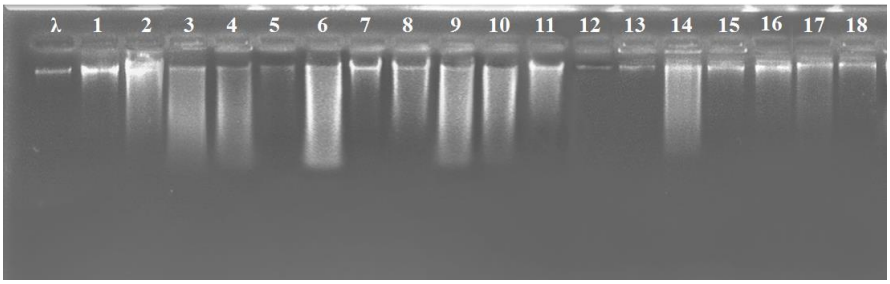
1. التحليل الكمي والنوعي لـ DNA المستخلص:

تراوح تركيز الـ DNA المستخلص من العينات المدروسة بين 441 و3885 نانوغرام/ ميكرو ليتر، كما كانت نوعية الـ DNA جيدة إذ تراوحت النسبة $OD_{260}\backslash OD_{280}$ بين 1.69 و1.77 (الشكل 1).



الشكل 1. تركيز ونوعية DNA في عينات اللحوم المختبرة

وتم تأكيد هذه النتائج من خلال هلام الأغاروز (الشكل 2) إذ بينت نتائج الرحلان الكهربائي أن طريقة الاستخلاص أعطت DNA بنوعية جيدة في جميع العينات على الرغم من وجود تحطم في بعض العينات وقد يعود ذلك إلى عمر الحيوان قبل ذبحه إذ تحدث عادةً تغيرات فيزيائية في النسيج الحيواني مع تقدم الحيوان بالعمر مما يؤثر على جودة وخصائص النسيج الحيواني كزيادة كمية الدهون الكلية في النسيج وتناقص الأنسجة الضامة مع زيادة عمر الحيوان (Vaclavik and Christian, 2003).

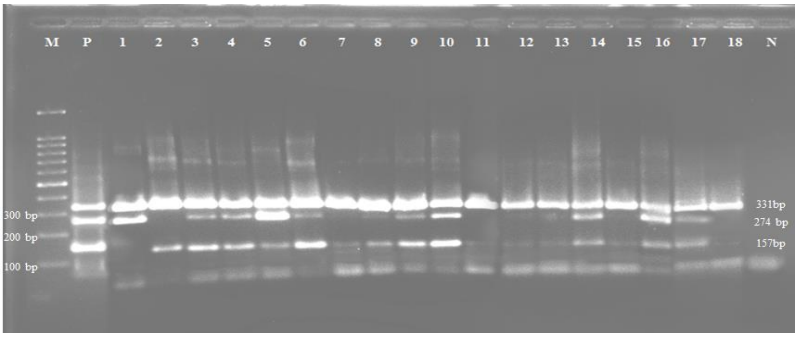


الشكل 2. الرحلان الكهربائي باستخدام هلام آغاروز تركيز 1% لـ DNA المستخلص من العينات المدروسة. المسار λ: 50 نانوغرام من المؤشر القياسي لامدا ، المسارات 1-18: الـ DNA المستخلص من عينات لحم الغنم المفروم المدروسة على التوالي.

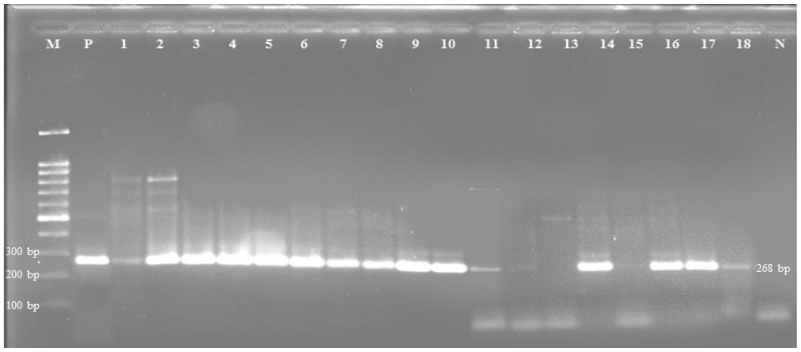
2. تفاعلات المكاثرة للعينات المدروسة باستخدام تفاعل الـ PCR:

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لجميع تفاعلات المكاثرة ظهور حزمة مفردة وفقاً للحجم المتوقع لكل نوع من اللحوم، إذ أمكن الحصول على القطعة المتوقعة من الغنم والبقر والمعز والدجاج والخنزير والديك الرومي وهي بطول 331 و274 و157 و268

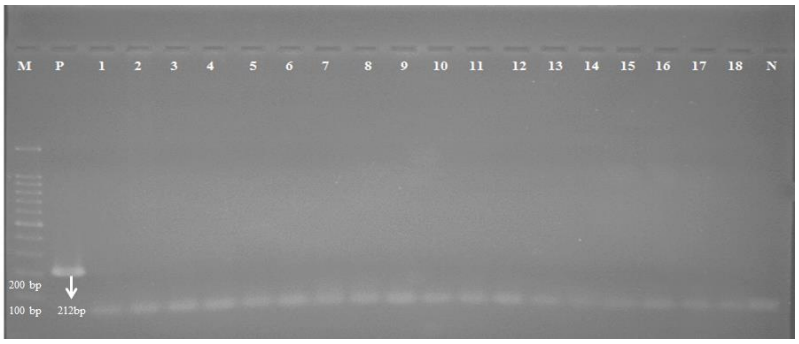
و212 و262 زوج قاعدي على التوالي (الشكل 3). كما بينت نواتج الـ PCR المتعدد لبادئات الغنم والبقر والمعز عدم وجود أي تفاعلات مشتركة بين البادئات إذ تتمتع مورثة السيتوكروم b باحتوائها على تسلسلات متخصصة بين العديد من المجموعات الفقارية (Ong *et al.*, 2007) وهذا يتفق مع دراسة استخدمت بادئات لنفس المورثة في نفس تفاعل الـ PCR وبدون حدوث تفاعلات مشتركة فيما بينها أيضاً (Atta Rashid *et al.*, 2014). كما تتوافق هذه النتائج مع دراسة أخرى استخدمت تقنية الـ PCR المتعدد المتخصص بالغنم والبقر بالاعتماد على نفس التسلسلات المحفوظة المشتقة من المورثة الميتوكوندرية سيتوكروم b المستخدمة في هذه الدراسة إذ كانت هذه الطريقة حساسة وقادرة على تعقب أي نوع من اللحوم حتى ضمن مزائج خليطة (Zarringhabaie *et al.*, 2011). وتجدر الإشارة إلى ظهور عُصابات ذات كثافات قليلة وغالباً يُعزى ذلك إلى حالات الغش غير المتعمدة والتي قد تحدث نتيجة التنظيف غير الجيد للمعدات المستخدمة في معالجة اللحوم التي تتبع أكثر من نوع (Cawthorn *et al.*, 2013).



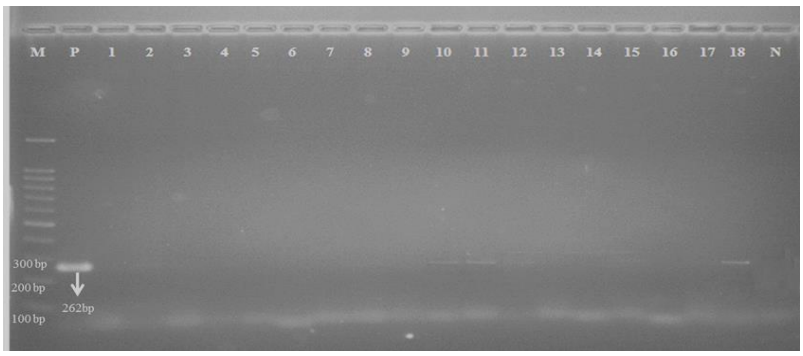
(A)



(B)



(C)

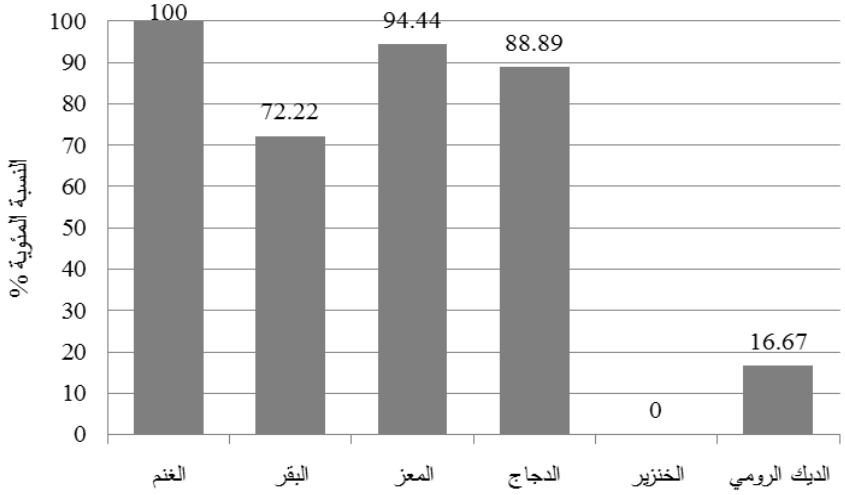


(D)

الشكل 3. نتائج الترحيل الكهربائي على هلام آغاروز تركيز 2% لتفاعلات المكاثرة الخاصة بالأنواع الستة المدروسة.

يمثل الشكل (A) تفاعل مكاثرة متعدد للغنم والبقر والمعز أما الأشكال B وC وD فهي تمثل تفاعلات المكاثرة المفردة للدجاج والخنزير والديك الرومي على التوالي. المسار (M): مؤشر قياسي 100 زوج قاعدي، المسار (N): شاهد السلبي المسار (P): شاهد الإيجابي، المسارات 1–18: عينات اللحم المختبرة .

ظهرت الحزمة المتخصصة بلحم الغنم في جميع العينات المدروسة، وهذا أمر طبيعي لكون مصدر هذه العينات هو لحم الغنم، ولكن تبين أن هذه العينات لم تكن مؤلفة من لحم الغنم الخالص إذ أشارت النتائج إلى ظهور العُصابات الدالة على لحم المعز والبقر والدجاج والديك الرومي بنسب 94.44% و72.22% و88.89% و16.67% على التوالي (الشكل 4).



الشكل 4. الأعداد والنسب المئوية للأنواع التي تم الكشف عنها في العينات المدروسة.

تشير النتائج إلى أن لحم المعز والدجاج كانا الأكثر تكراراً واستخداماً في الغش وقد يعود ذلك إلى توافرها بكثرة في البيئة المحلية (المعز) وإلى رخص ثمنها (الدجاج) بالمقارنة مع اللحوم المتبقية.

ومن ناحية أخرى تبين عدم وجود لحم الخنزير في أي عينة من العينات (الشكل C 3) وهذا لا يتفق مع دراسة أشارت إلى أنه يتم غش اللحوم الأكثر قيمة غذائية كالعجل والحمل بلحم الخنزير بسبب تشابهه في اللون والتركيب (Nesvadbová *et al.*, 2010). وقد يعود ذلك إلى ندرة لحم الخنزير وارتفاع أسعاره كونه غير مرغوب إلا من فئة قليلة من السكان من جهة، وتحريم استخدامه من جهة أخرى. كما لُوحظ وجود الحزمة الموافقة للحم الديك الرومي في ثلاث عينات فقط من العينات المدروسة (16.67 %) (الشكل D 3).

استطاعت تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز المتخصص بالأنواع Species specific PCR الكشف عن خلط أنواع اللحوم مع بعضها البعض وهذا ما أكدته نتائج هذه الدراسة بالإضافة إلى العديد من الدراسات الأخرى إذ تمكن Doosti وآخرون (2014) من التمييز بين البقر والغنم والخنزير والدجاج باستخدام هذه التقنية وقد تم الحصول على القطع المتوقعة للـ DNA بالأطوال 271 و274 و149 و266 زوج نكليوتيدي للأنواع المذكورة على التوالي. بينما أوضحت دراسة Mehdizadeh وآخرون (2014) أن هذه التقنية تتمتع بحساسية كشف عالية تصل إلى 0.1 % فقد تم فيها الكشف عن غش عينات من أقراص لحم العجل بلحم الدجاج وقد تبين أن 94.4 % من العينات كانت حاوية على لحم الدجاج دون التصريح بذلك.

الاستنتاجات:

نستنتج من الدراسة الحالية انتشار ظاهرة غش لحم الغنم بأنواع أقل قيمة غذائية أو مادية. وتُعد تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز باستخدام بادئات متخصصة دقيقة جداً في تمييز أنواع اللحوم المختلفة، مما شجع على استخدامها في الكشف عن غش اللحوم ومنتجاتها الذي قد يكون أحياناً غير متعمد أو غير مقصود وذلك نتيجة تلوث الأدوات المستخدمة في العمل بأنواع لحوم أخرى أو عدم التنظيف الجيد للماكينة عند التعامل مع نوع لحم آخر.

شكر:

أتوجه بجزيل الشكر إلى الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية– مركز بحوث حلب على مساهمتها بتمويل هذا البحث. بالإضافة إلى المشرفين الأفاضل الدكتورة رغداء أصلان والدكتور نعيم الحسين والدكتور فاتح خطيب والدكتور مصطفى اسعيد.

المراجع:

Aljanabi, S.M.; and I. Martinez (1997). Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques, Nucleic Acids Research. 25(22): 4692–4693.

Andrée, S.; Altmann; K. Binke; and F. Schwägele (2007). Animal species identification and quantification in meat and meat products by means of traditional and real-time PCR. Online publication: 1-4.

Atta Rashid, P.M.; M.O. Babashekh; A.S. Marouf; and K.M. Amin (2014). Identification of animal species in meat broth by simplex and multiplex PCR, Journal of Zankoy Sulaimani- Part A, 16(1): 97-102.

Bai, W.; R. Yin; J. Wang; C. Wu; Q. Dou; R. Yin; J. He; and G. Luo (2009). Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. Meat Science. 83(1): 38-44.

Ballin, N. (2010). Authentication of meat and meat products. Meat Science. 86 (3): 577-87.

Ballin, N.Z.; F.K. Vogensen; and A.H. Karlsson (2009). Species determination–Can we detect and quantify meat adulteration? Meat Science. 83(2): 165–174.

Cawthorn, D.M.; H.A. Steinman; and L.C. Hoffman (2013). A high incidence of species substitution and mislabeling detected in meat products sold in South Africa, Food Control. 32(2): 440-449.

Doosti, A.; P.G. Dehkordi; and E. Rahimi (2014). Molecular assay to fraud identification of meat products. Journal of Food Science and Technology. 51(1): 148-152.

Eaqub, A.M.; M. Abdur Razzak; S.B. Abd Hamid; M. Mahfujur Rahman; M. Al Amin; N.R. Abd Rashid, and Asing (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods, Food Chemistry. 177: 214–224.

Eaqub, A.M.; U. Hashim; S. Mustafa; and Y. Bin Che Man (2012). Swine-Specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome B gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products. Food Anal. Methods. 5(3): 613–623.

Garcia, C.M.; M. Dominguez; C. Garcia-Ruiz; and L. Marina (2006). Reversed-phase high-performance liquid chromatography applied to the determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products. Analytica Chimica Acta., 559(2): 215-220.

Girish, P.S.; A.S.R. Anjaneyulu; K.N. Viswas; M. Anand; N. Rajkumar; B.M. Shivakumar; and S. Bhaskar (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. Meat Science. 66(3): 551-556.

Gowda, C. (2013). Authentication of species of beef using polymerase chain reaction (PCR) based techniques. M.C.s Thesis. Department of livestock products technology, Veterinary college, Sciences University, Bidar. Pp 144.

Hellberg, R.S.R and M.T. Morrissey (2011). Advances in DNA-Based Techniques for the Detection of Seafood Species Substitution on the Commercial Market, Food Science and Technology. 16(4): 308–321.

Herman, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR, Journal of Dairy Research. 68(3): 429-436.

Ilhak, O.I. and A. Arslan (2007). Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR), Turk. J. Vet. Anim. Sci., 31(3): 159-163.

Imaizumi, K.; T. Akutsu; S. Miyasaka; and M. Yoshino (2007). Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA, Int J Legal Med., 121(3): 184–191.

Janssen, F.W.; G.H. Hagele; J.B. Buntjer; and J.A. Lenstra (1998). Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 21(3): 115–120.

Kang'ehte, E.; J. Gathuma; and K. Lindqvist (1986). Identification of species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony`s double diffusion test. J. Sci. Food Agric., 37(2): 157-64.

Kesmen, Z.; A.E. Yetiman; F. Sahin; and H. Yetim (2012). Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays. Journal of Food Science. 77(2): 167-173.

Kumari, R. (2007). Meat Species Identification by real time PCR. M.C.s Thesis. Department of animal biotechnology, College of veterinary science and animal husbandry, Agricultural University, Anand. Pp 67.

Lees, M. (2003). Food authenticity and traceability: Meat and meat products, Woodhead Publishing, 1st Ed, USA.

Lenstra, J. (2003). Food authenticity and traceability: DNA methods for identifying plant and animal species in food, Florida: CRC Press, 1stEd, USA.

Mahajan, M.V.; Y.P. Gadekar; V.D. Dighe; R.D. Kokane; and A.S. Bannalikar (2011). Molecular detection of meat animal species targeting MT 12 S rRNA gene, Meat Science. 88(1): 23-27.

Mehdizadeh, M.; S.M. Mousavi; M. Rabiei; K. Moradian; S. Eskandari; M.A. Fesarani; H. Rastegar; and M. Alebouyeh (2014). Detection of chicken meat adulteration in raw hamburger using polymerase chain reaction. Journal of Food Quality and Hazards Control. 1(2): 36-40.

Mašková, E.; and I. Paulíčková (2006). PCR-Based Detection of Cow's Milk in Goat and Sheep Cheeses Marketed in the Czech Republic. Czech J. Food Sci., 24(3): 127-132.

Nakyinsige, K.; Y. Che man; and A. Sazili (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products, Meat Science. 91(3): 207-214.

Nesvadbová, M.; A. Knoll; and A. Vašátková (2010). Selection of the most suitable method for the extraction of DNA from foods and feeds for species identification. Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis. 58(2): 169-174.

Ong, S.B.; M.I. Zuraini; W.G. Jurin; Y.K. Cheah; R. Tunung; L.C. Chai; Y. Haryani; F.M. Ghazali; and R. Son (2007). Meat molecular detection: Sensitivity of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. ASEAN Food Journal. 14 (1): 51-59.

Ran, G.; L. Ren; X. Han; X. Liu; Z. Li; D. Pang; H. Ouyang; and X. Tang (2015). Development of a rapid method for the visible detection of pork DNA in Halal products by loop-mediated isothermal amplification. Food Anal. Methods. 9(3): 565-570.

Sambrook, J.; and D. Russel (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Ed, New York, USA.

Singh, P.; and S. Neelam (2011). Meat species specifications to ensure the quality of meat: a review, Inter. J. of Meat Sci., 1(1): 15-26.

Singh, V.; and N. Sachan (2009). Laboratory manual of abattoir practices and animal by-products technology, DUVASU, Mathura. 25-35.

Singh, Y.; M.N. Brahmbhatt; C.D. Bhongm; S. Jain; and C.G. Joshi (2007). Detection of meat species by polymerase chain reaction of actin gene family. Haryana Vet. 46(10): 25-27.

Vaclavik, V.A.; and W.E. Christian; (2003). Instructor's manual for essentials of food science. Meats, Poultry, and Fish, MA: Springer, 3rd Ed, Boston, USA.

Van Raamsdonk, L.W.D.; C. Von Holst; V. Baeten; G. Berben; A. Boix; and J. De Jong (2007). New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. Animal Feed Science and Technology. 133(1–2): 63–83.

Volk, H.; S. Piskernik; M. KurinČIČ; A. Klancnik; N. Toplak; and B. Jeršek; (2014). Evaluation of different methods for DNA extraction from milk, Journal of food and nutrition research. 53(2): 97-104.

Weder, R.; K.P. Jurgen; and K. Kaiser (2001). On the specificity of the tuna – directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. Eur. Food. Res. Technol., 213(2): 139-144.

Yosef, T.A.; M.Z. Al- Julaifi; and A.M. AL-Rizqi (2014). Food forensics: Using DNA-Based technology for the detection of animal species in meat products. Nature and Science. 12(6): 82-90.

Zarringhabaie, G.E.; N. Pirany; and A. Javanmard (2011). Molecular traceability of the species origin of meats using multiplex PCR, African Journal of Biotechnology. 10(73): 15461-16465.

Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique to Detect Sheep Meat Adulteration

Raghdaa Aslan[(1)] Naiem Al Hussein[(2)] Fateh Khatib[(3)] Mustafa Asaeed[(4)] and Asmaa Maaz*[(1)]

(1). Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Technical Engineering, Aleppo University, Aleppo, Syria.
(2). Aleppo Research Center, General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Damascus, Syria.
(3). Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Aleppo, Syria.
(4). Department of Food Technology, Faculty of Technical Engineering, Aleppo University, Aleppo, Syria. (*Corresponding author: Asmaa Maaz. E-Mail: asmaa.990@hotmail.com).

Received: 16/09/2017 Accepted: 24/10/2017

Abstract:
Consumers, especially in poor countries, suffer from many kinds of meat adulteration by substituting cheaper and less nutritious meat with costly ones. Traditional morphological analysis or others based on component analysis are usually applied to identify undeclared meats, but these methods often produce incorrect or unreliable results, Therefore, finding more precise and reliable methods is critical in food authentication. DNA-based techniques have been widely used in this field due to their sensitivity, speed and high accuracy. In this study, species- specific PCR technique was employed to analysis 18 sheep meat samples to detect substitutions with beef, goat, chicken, turkey or pork meat. The detection process was based on specific primers targeting cytochrome b coding gene. The results showed that all samples were mixed with one or more types of meat. The expected fragment of DNA was obtained from each pair of other used primers. Cheating with goat meat was the most frequent among samples with a ratio of 94.44%. while the lowest frequent was with turkey 16.66%, and finally, adulteration with pork meat was not recorded in any sample.

Key Words: Species specific PCR, Meat adulteration, Cytochrome b gene.