المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، العدد ١، ٢٠٠٩ (٤٣-٤٦)

التعرف على لحوم الأبقار بواسطة تقنية تباين أطوال قطع التقييد للتفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR)

رعد عبد الغني السنجري

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

(الاستلام ١٨ تشرين الثاني ٢٠٠٨؛ القبول ١٩ شباط ٢٠٠٩)

الخلاصة

لتمييز لحوم الأبقار عن بقية اللحوم الأخرى الصالحة للاستهلاك البشري بواسطة تقنية تباين أطوال قطع التقييد RFLP المبنية على أساس التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR استخدم زوج من البادئات العامة المصممة على جين السيتوكروم ب لمجين الميتوكوندريا للحصول على الحزمة المتضاعفة ذات الوزن الجزيئي359 زوج قاعدي ثم استخدم بعد ذلك مجموعة من الأنزيمات القاطعة *Tru*91, *Rsa*I, *Hinf* I, *Hae* III, *Alu* I, *Taq* I, *Mob* I لهضم الحزمة المتضاعفة، أظهرت النتائج حصول هضم أو تقطيع للحزمة المتضاعفة عند استخدام الأنزيم *Hinf* I فقد ظهرت ثلاثة حزم وبوزن جزيئي 198 و 117 و 44 زوج قاعدي بينما إنزيم ألـ *Hae* III أظهر حزمتين وبوزن جزيئي 285 و 74 زوج قاعدي أما الأنزيم *Alu* I فأظهر أيضا حزمتين ولكن بوزن جزيئي 190 و 169 زوج قاعدي ولم يحصل هضم للقطعة المتضاعفة ببقية الإنزيمات الأخرى المستخدمة في الدراسة واعتبرت هذه النتيجة صفة تمييزية للحوم الأبقار مقارنة مع لحوم الحيوانات الأخرى عند استخدام نفس الأنزيمات.

Identification of beef using restriction fragment length polymorphism–polymerase chain reaction

R. A. Al-Sanjary

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

Abstract

To differentiate the beef from other types of meat consumed by human, DNA markers based on polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism technique is performed by using universal primers designed on mitochondrial cytochrome b gene to obtain amplified band 359 bp, then digested with some of restriction enzymes like *Tru*91, *Rsa*I, *Hinf* I, *Hae* III, *Alu* I, *Taq* I, *Mob* I. The result revealed that, the *Hinf* I enzyme produce three bands 198, 117, 44 bp and the *Hae* III enzyme revealed two band 285, 74 bp, the *Alu* I enzyme also produced two band but the molecular weight are 190, 169 bp. The other enzymes did not reveal any digestion of the amplified bands and this result is a characteristic unique to beef compared with other types of meat when using same enzymes.

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

المقدمة

إن تحديد أصل ومعرفة عائدية الغذاء وخصوصا اللحوم أصبح من الأمور المهمة ومن التحديات التي تواجه العاملين في مجال فحص وصحة اللحوم (1) وواحدة من هذه التحديات هي أساليب الغش ووضع المعلومات الخاطئة على مصنعات اللحوم ومنتجاتها وتعتبر هذه الأساليب عادة مرفوضة من قبل أنظمة وقوانين أي دولة بشكل عام وكذلك من قبل المستهلك بشكل

خاص لأسباب اقتصادية أو دينية أو صحية (3،2)، وعادة فإن أنواع اللحوم الباهضة الثمن في الأسواق تكون هدفاً للغش أو الاستبدال بأنواع أرخص ثمنا وهذه من المشاكل الكبيرة التي تواجهها بعض الدول وخصوصا في تصنيع اللحوم المثرومة ففي فلندا مثلا تغش لحوم الأبقار بأنواع من اللحوم الأرخص ثمنا مثل لحوم الخنازير وكذلك في انكلترا وأمريكا تغش لحوم الأبقار بواسطة لحوم الأفراس والخيول وتخلط معها عند إنتاج اللحوم المثرومة (4)، إضافة إلى اهتمام المستهلك اليوم بمعرفة هوية المنتج الغذائي لأسباب أخرى منها تأكده من خلوه من الأمراض الخطيرة والمشتركة التي تنتقل عن طريق هذه الأغذية مثل مرض جنون البقر وغيرها من الأمراض التي تصيب الحيوانات وبالتالي انتقال مسبباتها عن طريق اللحوم (5).

استخدمت طرق كثيرة وعديدة لمعرفة عائدية وأصل أنواع اللحوم وخصوصا الأنواع الجيدة ذات الأسعار العالية وتمييزها عن اللحوم الأخرى ذات النوعيات الرديئة ولكن أفضلها هي الطرق المبنية على أساس تحليل الدنا الذي يتصف عادة بثباته وصموده تجاه العوامل والظروف الخارجية بالإضافة إلى وجوده في جميع خلايا الكائن الحي مما سهل عملية الفحص لعدم التقيد بنوع العينة المفحوصة (6) وقد استخدمت موشرات عديدة مبنية على أساس تحليل الدنا تستخدم في تمييز أنواع الحيوانات ومنتجاتها منها تقنية النوع المتخصص Species-specific PCR (8،7) وكذلك مؤشرات في تمييز الأفراد ضمن النوع الواحد من خلال استخدام بادئات مصممة على جين السيتوكروم ب في مجين الميتوكوندريا بواسطة تقنية تباين أطوال قطع التقييد RFLP_PCR (9).

يعتبر جين السيتوكروم ب من الجينات المهمة الواقعة في مجين المتوكوندريا والتي يمكن الاستفادة منها في تمييز أنواع الفقريات (11،10) فيتم تصميم بادئات على هذا الجين والذي يسمح بحصول تضاعف لملايين المرات من خلال تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا ومن ثم تحديد نوع الكائن الحي على أساس هذا الموقع أو التتابع الخاص بذلك النوع من خلال هضم هذه القطع بواسطة الإنزيمات القاطعة بتقنية الـ RFLP (13،12) وتعتبر طريقة RFLP-PCR من الطرق البسيطة والتي لا تحتاج إلى وقت كبير لانجازها ولا تحتاج إلى معرفة تتابع الدنا للكائن الحي لتصميم بادئات خاصة به بالإضافة إلى وجود الأنزيمات القاطعة الكثيرة التي من خلالها يتم تمييز أنواع الحيوانات وكذلك ضمن نوعها لنفس الجنس (14،13)، ولغرض تمييز لحوم الأبقار عن بقية اللحوم الأخرى من خلال عمل الانزيمات القاطعة، أجريت هذه الدراسة باستخدام زوج من البادئات العامة المصممة على جين السيتوكروم ب للحصول على حزمة عامة بوزن جزيئي 359 زوج قاعدي ثم هضمها ببعض الإنزيمات القاطعة ليتم مقارنتها مع نتائج الدراسات السابقة والتي استخدمت فيها نفس البادئات ونفس الإنزيمات ولكن على حيوانات أخرى.

المواد وطرائق العمل

جمعت عينات من لحوم الأبقار من محلات الجزارة في مدينة الموصل ووضعت في أكياس نايلون معقمة، ثم جلبت إلى المختبر واستخلص الدنا منها اعتمادا على طريقة (15) وكذلك تم إعداد تفاعلات التضاعف لتقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا بالاعتماد على ما ورد في (16،13) حيث تم استخدام المحاليل التالية وهي محلول منظم 10X وماء مقطر غير مؤين معقم وقواعد نتروجينية ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين وأنزيم بلمرة الدنا وزوج من البادئات العامة المصممة على جين السيتوكروم ب لمجين الميتوكوندريا المجهزة من شركة Germany promega وكان تتابع هذه البادئات هو كما يلي:

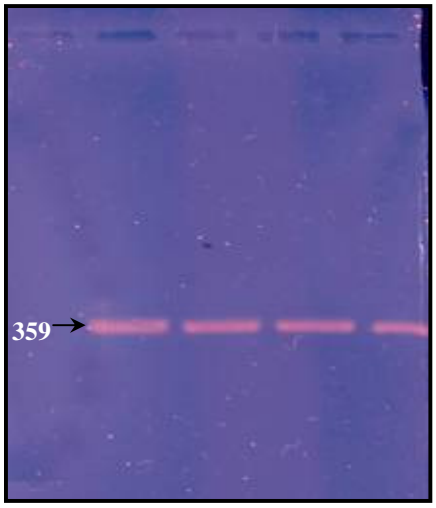
البادئ الأول	CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA
البادئ الثاني	GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA

توضع الأنابيب الحاوية على المواد المذكورة أعلاه في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler من شركة Germany Eppendorf ويبرمج الجهاز بالبرنامج الخاص بهذا التفاعل (95° م لمدة 4 دقيقة خلال دورة واحدة و 95 °م لمدة دقيقة و55° م لمدة دقيقة و 72 °م لمدة دقيقة خلال ثلاثين دورة و 72 °م لمدة 7 دقيقة خلال دورة واحدة) (14،13) ثم يتم ترحيل الناتج بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي، يصبغ الهلام، ثم يصور. وبعد الحصول على الحزمة المتضاعفة ذات الوزن الجزيئي 359 زوج قاعدي يتم استخدام بعض الأنزيمات القاطعة لهضم الحزمة *Tru*91, *Rsa*I, *Hinf* I, *Hae* III, *Alu* I, *Taq* I, *Mob* I وعلى درجة حرارة معينة (حسب الأنزيم) في الحمام المائي لمدة ثلاث ساعات وخلال عملية الهضم بالأنزيم سوف ينتج قطعتين أو أكثر أو لا ينتج أية قطع حسب نوع الأنزيم القاطع المستخدم.

النتائج

أظهرت الدراسة التي أجريت باستخدام البادئ العام لجميع الحيوانات Universal primer بنوعيه الأول والثاني حزمة واحدة لجميع عينات لحم الأبقار وبوزن جزيئي 359 زوج قاعدي لكل حزمة والمرحلة مع الدليل الحجمي القياسي Ladder DNA 100 bp كما في (الشكل 1).

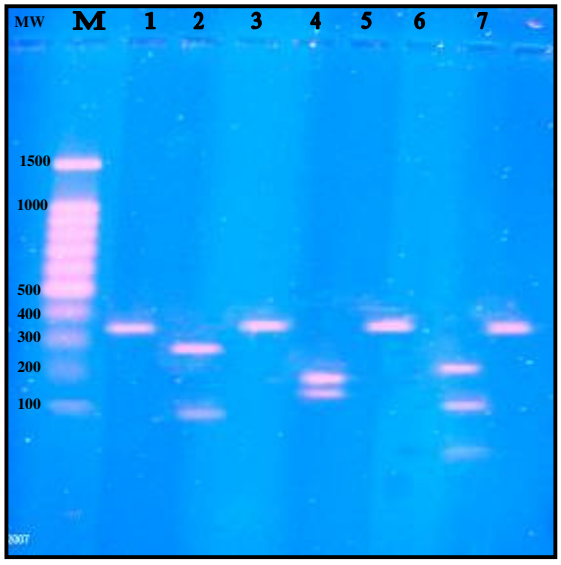
ولتمييز لحوم الأبقار عن باقي لحوم الحيوانات الأخرى فقد تم اختيار مجموعة من الأنزيمات القاطعة، فقد أظهرت النتائج انه باستخدام كل من أنزيم *Tru* 91, *Rsa* I, *Taq* I, *Mob* I لهضم الدنا المتضاعف للحوم الأبقار لم يحصل أي هضم للقطعة المتضاعفة ذات الوزن الجزيئي 359 زوج قاعدي في حين حصل هضم أو تقطيع للحزمة المتضاعفة عند استخدام الأنزيمات القاطعة الأخرى، فبالنسبة لأنزيم *Hinf* I ظهرت ثلاثة حزم وبوزن جزيئي 198 و 117 و 44 زوجاً قاعدياً بينما إنزيم ألـ *Hae* III أظهر حزمتين وبوزن جزيئي 285 و 74 زوج قاعدي أما الأنزيم Alu I فأظهر أيضا حزمتين ولكن بوزن جزيئي 190 و 169 زوج قاعدي وكما في (الشكل 2).



الشكل (1) نتائج تضاعف دنا لحم الأبقار على شكل حزمة ذات وزن جزيئي 359 زوج قاعدي باستخدام البادئ العام والمرحلة مع الدليل الحجمي القياسي (M) Ladder 100bp على هلام الأكاروز 1.2 %.

المناقشة

إن تقنية تباين أطوال قطع التقييد RFLP هي إحدى مؤشرات الدنا المبنية على أساس تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR والتي نحصل من خلالها على حزمة متضاعفة خاصة بنوع البادئ المصمم على جين معين من جينات الكائن الحي وبعد هضم هذه الحزمة نحصل على حزم ذات أطوال مختلفة نستطيع من خلالها تمييز الحيوانات (13). يعتمد الوزن الجزيئي للحزمة المتضاعفة ما بين الحيوانات على البادئ العام الذي يصمم على جين معين، حيث وجد بأن هناك اختلاف في حجم القطعة المخصصة لكل نوع اعتمادا على الجين والبادئ المصمم عليه (17). ففي دراسة لتمييز الأبقار تم استخدام بادئات مصممة على جين 12SrRNA فكان حجم الحزمة 223 زوجاً قاعدياً (18)، بينما كان حجم الحزمة 294 زوجاً قاعدياً عندما استخدم البادئ المصمم على جين 28SrRNA (19)، وقد استغل الباحثين مجين الميتوكوندريا في تصميم البادئات لوجود أكثر من جين فيها (11). إن البادئ المستخدم في هذه الدراسة هو بادئ مصمم على جين السيتوكروم ب في مجين الميتوكوندريا والذي ينتج عنه حزمة متضاعفة ذات وزن جزيئي 359 زوج قاعدي والمصمم من قبل (13) ولهذا اتفقت نتائج دراستنا الخاصة بلحم الأبقار مع نتائج دراسات أخرى والتي استخدمت نفس البادئ ولكن طبقت على حيوانات أخرى في الحصول على حزمة متضاعفة ذات وزن جزيئي 359 زوج قاعدي (14،20-22) عندما استخدمت البادئ العام نفسه وموقع ارتباطه في جين السيتوكروم ب (الدنا الهدف).



الشكل (2) نتائج هضم الحزمة المشتركة 359 زوج قاعدي للحوم الأبقار بواسطة الأنزيمات القاطعة (1) *Tru* 91 و(2) *Hae* III و (3) *Rsa*I و (4) *Alu* I و (5) *Taq* I و (6) *Hinf* I و (7) *Mob* I والمرحلة مع الدليل الحجمي القياسي Ladder 100 bp (M) على هلام الأكاروز 2 %.

إن الأنزيمات القاطعة المستخدمة في أي دراسة يجب أن يتم اختيارها بشكل مناسب لكي تظهر نتائج تسمح من خلالها تمييز الأنواع المختلفة من الحيوانات وكذلك التعرف على أصل أو عائدية منتجاتها حتى في حالة مزجها أو خلطها مع بعضها كما في حالة تصنيع اللحوم المثرومة (12) إضافة إلى ذلك فان طريقة RFLP ليس فقط تستخدم في التمييز ما بين الأنواع المختلفة من الحيوانات (ابقار، جاموس، أغنام.. وغيرها) وإنما

تستطيع كذلك تمييز الحيوانات ضمن النوع الواحد (13). ففي هذه الدراسة أظهرت النتائج انه حصل هضم أو تقطيع للحزمة المشتركة أو المتضاعفة عند استخدام الأنزيمات القاطعة الأخرى فظهرت ثلاثة حزم وبوزن جزيئي 198 و 117 و 44 زوجاً قاعدياً بالنسبة لأنزيم *Hinf* I بينما إنزيم ألـ *Hae* III أظهر حزمتين وبوزن جزيئي 285 و 74 زوج قاعدي أما الأنزيم *Alu* I فأظهر أيضا حزمتين ولكن بوزن جزيئي 190 و 169 زوجاً قاعدياً وهذه النتائج تتفق مع نتائج كل من (14) في دراستهم في تمييز لحوم ثمانية أنواع من الحيوانات من ضمنها لحوم الأبقار استخدمت فيها أربعة إنزيمات هاضمة للحزمة المتضاعفة وكذلك مع نتائج (13) الذين استخدموا ستة إنزيمات قاطعة لتمييز عشرة أنواع من الحيوانات من ضمنها الأبقار عندما استعملوا نفس البادئ المصمم على جين السيتوكروم ب و بوزن جزيئي 359 زوج قاعدي، في حين اختلفت نتائج دراستنا من حيث حجم القطع الناتجة من عملية الهضم بالأنزيمات القاطعة مع نتائج دراسة أخرى (12) اللذين استخدموا بادئ مصمم على جين السيتوكروم ب لإنتاج حزمة متضاعفة بوزن جزيئي 464 زوج قاعدي و تم تمييز 23 نوعاً من الحيوانات وباستخدام 11 إنزيماً قاطعاً، وكذلك في هذه الدراسة أظهرت النتائج أنه لم يحصل أي هضم للقطعة المتضاعفة ذات الوزن الجزيئي 359 زوجاً قاعدياً عند استخدام كل من أنزيم *Tru* 91, *Rsa* I, *Taq* I, *Mob* I وهذه أيضا تعتبر صفة تمييزية للحوم الأبقار مقارنة مع لحوم الحيوانات الأخرى عند استخدام نفس الأنزيمات، و تستخدم هذه التقنية بشكل واسع في تمييز بعض الحيوانات لاسيما ذات صلة القرابة القوية مع بعضها والتي لا يمكن تمييزها إلا باستخدام الإنزيمات القاطعة (24،23).

شكر وتقدير

أشكر عمادة كلية الطب البيطري، جامعة الموصل على توفير الأجهزة و الدكتور عبد الواحد أحمد حسن على تزويدي بالمواد والأنزيمات القاطعة المستخدمة في هذا البحث.

المصادر

1. Skrokki A, Hormi O. Composition of minced meat. Part A: Methods. Meat Science 1994; 38: 497-501.
2. Buntjer JB, Lenstra JA, Haagsma N. Rapid species identification in meat by using satellite DNA probes.Z lebensm Unters Forsch 1995; 201 : 577-582.
3. Lenstra JA, Bradley DG. Systematics and phylogeny of cattle.CAB Intl. Ed. by R. Fries and A. Ruvenski 1999;1: 1-14.
4. King NL. Species identification of cooked meats by enzyme staining of isoelectric focussing gels. Meat Science 1984 ;11: 59-64.
5. Brodmann P. Development and Validation of species identification, Ph.D. Thesis. University of Basel ; 2002.
6. Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, Poinar GO. Amplification and sequencing of DNA from a 120 - 135 million–year–old weevil. Nature 1993; 363:536-538.
7. Al-Sanjary RA, Jubrael JMS. Differentiation between different animal meats using a species-specific Polymerase Chain Reaction.12th Scientific Congress 10-12 December,Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University ; 2006.
8. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y. A quick and simple method for the identification of meat products by PCR assay. Meat Science 1999 ; 51(2): 143-148.
9. Verkaar ELC, Nijman I J, Boutaga K, Lenstra JA. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. Meat Science 2002 ; 60: 365-369.
10. Chikuni K, Tabata T, Kosugiyama M, Monma M, Saito M. Polymerase Chain Reaction assay for detection of Sheep and Goat meats. Meat Science 1994 ; 37: 337-345.
11. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1989 ; 86: 6196-6200.
12. Wolf C, Rentsch J, Hubner P. PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA : A reliable methods for species identification. J. Agric. Food Chem. 1999 ; 47: 1350-1355.
13. Meyer R, Hofelein C, Luthy J, Candrian U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. J. AOAC Int. 1995 ; 78: 1542-1551.
14. Abdulmawjood A, Bulte M. Identification of Ostrich Meat by Restriction Fragment Length Polymorphism's (RFLP) Analysis of cytochrome b Gene. Journal of Food Science 2002 ; 67(5): 1688-1691.
15. Maniatis T, Fritsh EF, Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold spring Harbor laboratory, New York. 1982.
16. Bottero MT, Civera T, Anastasio A, Turi RM, Rosati S. Identification of cow 's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. J. Food Prot. 2002 ;65(2): 362-366.
17. Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. A multiplex PCR assay for identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes. 2004 ;18: 81-87.
18. Lopez-Calleja I, Gonzalez I, Fajardo V, Rodriguez MA, Hernandez PE, Garcia T, Martin R. Rapid Detection of Cows milk in Sheep and Goats milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. J. Dairy Sci. 2004 ;87: 2839-2845.
19. Bellis C, Ashton KJ, Freney L, Blair B, Griffiths LR. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. Forensic science international 2003; 134: 99-108.
20. Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfre F. Identification of species in animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA. J. Agric. Food Chem. 2001 ; 49: 3775-3781.
21. Wang H, Lee S, Chong T, Wong M. Examination of meat Components in commercial Dog and Cat feed by using Polymearase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism's (PCR-RFLPs) Technique. J. Vet. Med. Sci. 2004 ; 66(7) : 855-859.
22. Partis I, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, Murby J. Evaluation of DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. Meat Science 2000 ; 54: 369-376.
23. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Nakai H, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y. Determination of Mitochondrial Cytochrome B Gene sequence for Red Deer (Cervus elaphus) and the Differentiation of closely related Deer meats. Meat Science 1998 ; 49(4): 379-385.
24. Lahiff S, Glenuon M, Brien L, Lyng J, Smith T, Maher M, Shilton N. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bon meat (MBM). Molecular and Cellular Probes 2001 ; 15: 27-35.