پنجمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، دانشکده کشاورزی
۲۷-۲۸ بهمن ماه ۱۳۸۹

تشخیص تقلب و آلودگی در خوراک دام و بررسی جمعیت‌های قارچ‌های شکمبه بر اساس روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

حسین محمدی*[1]، محمد مرادی شهربابک[1] و مصطفی صادقی[1]

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول: حسین محمدی، آدرس اینترنتی: mohammadi37@ut.ac.ir

چکیده

با توجه به شرایط کنونی و رشد چشمگیر علم ژنتیک و بویژه تکنیک‌های مولکولی به آسانی می‌توان بسیاری از تخلفات و تقلبات خاموش در مواد غذایی و خوراک دام و طیور را شناسایی و تفکیک نمود. بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه با استفاده از روش‌های کشت سنتی به خاطر سیکل زندگی منحصر به فرد این دسته از فلور میکروبی شکمبه که شامل دو فاز جدای متحرک و فاز تشکیل کلونی بسیار مشکل و زمان‌بر و در بعضی موارد غیر ممکن است. امروزه با معرفی روش‌های مولکولی بر پایه توالی‌های حفاظت شده DNA تشخیص این فلور میکروبی و تغییرات جمعیت آن‌ها در محیط شکمبه علاوه بر سادگی از دقت بالایی نیز برخوردار است. هدف این تحقیق بررسی امکان شناسایی تقلب و شناسایی گونه-های استفاده شده (نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان) در خوراک دام و بررسی تغییرات جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه تحت جیره‌های مختلف با استفاده از روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بود. نتایج این بررسی نشان داد با آزمونهای مبتنی بر PCR می‌توان آلودگی‌های احتمالی در خوراک را تشخیص داده و با صحت بالایی تغییرات جمعیت قارچ های شکمبه مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: خوراک دام، قارچ‌های شکمبه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

تشخیص گونه‌ها در محصولات غذایی با استفاده از ژن‌های مخصوص و بکارگیری روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است(٤). بیماریهایی چون جنون گاوی و آنفولانزای مرغی، سوء استفاده بعضی از تولید کنندگان مواد غذایی و خوراکی، حساسیت‌های غذایی و غذاهای ترانس ژنیک باعث افزایش نگرانی مردم در خصوص ترکیبات محصولات غذایی و خوراکی شده است. از جمله مزیت‌های روش PCR نسبت به سایر روش‌ها می‌توان دقت و سرعت زیاد، حساسیت بالا و انعطاف پذیری این روش نسبت به سایر روش‌ها اشاره کرد. دالماسو و همکاران (٢٠٠٤) با طراحی آغازگرهای اختصاصی از نواحی متفاوت DNA میتوکندری (12S rRNA و 16S rRNA) جهت تشخیص تقلب در خوراک حیوانات چهار دسته از حیوانات(٣ گونه نشخوار کننده، ٢ گونه پرنده، خوک سانان و ١٢ گونه ماهی) را شناسایی نمودند. که نتایج وجود تقلب در مواد خوراکی را اثبات کردند(١). قوتی و همکاران(٢٠٠٩) با تاکید بر برخی از نواحی ژنی متفاوت DNA میتوکندری (12S rRNA و 16S rRNA) و آزمودن نمونه‌های مواد غذایی (سوسیس، کالباس و گوشت چرخ کرده) نسبت به شناسایی و ردیابی گونه‌ای حیوانی استفاده شده اقدام نمودند که نتایج نشان از اعمال تقلب در برخی از این فرآورده‌های غذایی و صنعتی داشت(٤).

امروزه قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه به عنوان جزء مهمی از فلور میکروبی شکمبه شناخته شده‌اند. اخیراً با معرفی روش‌های مولکولی بر پایه توالی‌های حفاظت شده DNA همچون توالی 18S rDNA تشخیص این فلور میکروبی و تغییرات جمعیت آنها در محیط شکمبه علاوه بر

سادگی از دقت بالایی نیز برخوردار می‌باشند. یک روش در زمینه بررسی کمی فلور میکروبی روش PCR رقابتی است. این روش علاوه بر دقت بالا به دلیل استفاده از PCR و به لحاظ تجهیزات نسبت به روش‌های استفاده از نشانگر و روش Real-Time PCR از هزینه کمتری برخوردار است(۳). اساس این روش تکثیر همزمان دو قطعه DNA با اندازه‌های مختلف به لحاظ جفت باز و آغازگرهای یکسان، در یک واکنش PCR می‌باشد. چنانچه این دو قطعه در یک واکنش PCR به عنوان الگوهای تکثیر قرار بگیرند، براساس غلظت‌های اولیه‌شان بر سر محتوی واکنش PCR رقابت کرده و می‌توان از روی نسبت شدت باندهای محصولات PCR این دو قطعه بر روی ژل آگارز، غلظت اولیه DNA هدف را به طور نسبی مورد ارزیابی قرار داد(۵).

هدف از این مطالعه، ۱- تحقیق جهت توسعه و بهینه نمودن Multiplex PCR از نواحی ژنی 12S rRNA و 16S rRNA برای تشخیص اختصاصی نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان در پودرماهی جهت تشخیص تقلب در پودر ماهی.

۲- امکان استفاده از روش PCR رقابتی جهت تعیین تغییرات جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی تحت جیره‌های حاوی کنجاله سویا و کنجاله کلزا بود.

مواد و روشها

۱- استخراج DNA از نمونه‌ها به روش گوانیدین تیوسیانات-سیلیکاژل صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت Multiplex با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(۱) نشخوار کنندگان، طیور و خوک سانان انجام گرفت.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی گونه

آغازگرها	گونه های تشخیصی	توالی آغازگرها	نواحی ژنومی	قطعات تولیدی(bp)
Ruminant	گاو، گوسفند و بز	**5′ GAA AGG ACA AGA GAA ATA AGG 3′** **5′ TAG GCC CTT TTC TAG GGC A 3′**	16S rRNA	۱۰٤
Poultry	مرغ و بوقلمون	**5′ TGA GAA CTA CGA GCA CAA AC3′** **5′ GGG CTA TTG AGC TCA CTG TT 3′**	12S rRNA	۱۸۳
pork	خوک	**5′ CTA CAT AAG AAT ATC CAC CACA 3′** **5′ ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT 3′**	12S rRNA-tRNA Val	۲۹۰

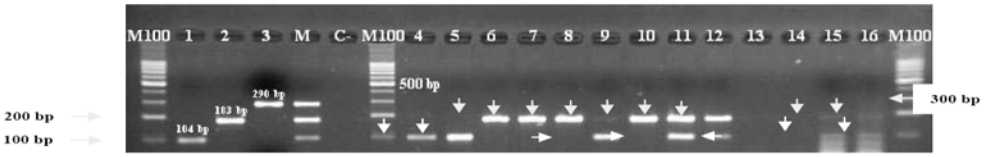
۲- استخراج DNA از نمونه‌های مایع شکمبه به روش گوانیدین تیوسیانات-سیلیکاژل صورت گرفت. از یک جفت آغازگر اختصاصی (GAF) که در جدول ۲ مشاهده می‌شود استفاده شد(۲). به منظور سنتز قطعه کنترل استاندارد از یک جفت آغازگر به صورت overhang که دارای توالی آغازگر GAF در دو انتهای خودش بود استفاده گردید(جدول ۲). این قطعه را از توالی DNA فاژ لامبدا تکثیر شد و به عنوان رقابتگر در واکنش PCR رقابتی مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده به منظور انجام واکنش PCR

گونه قارچی	
قارچ بی هوازی	**GAF1**:5′-GAG GAA GTA AAA GTC GTA ACA AGG TTT C- 3′ **GAF2**:5′-CAA ATT CAC AAA GGG TAGG ATG ATT T-3′
فاژ لامبدا	**LaGAF1**:5′- gag gaa gta aaa gtc gta aca agg ttt c GAA GTT CGC AGA ATC GTA TGT G-3′ **LaGAF2**:5′- caa att cac aaa ggg tag gat gat tt .GCT GTG GAC ATA GTT AAT CCG-3′

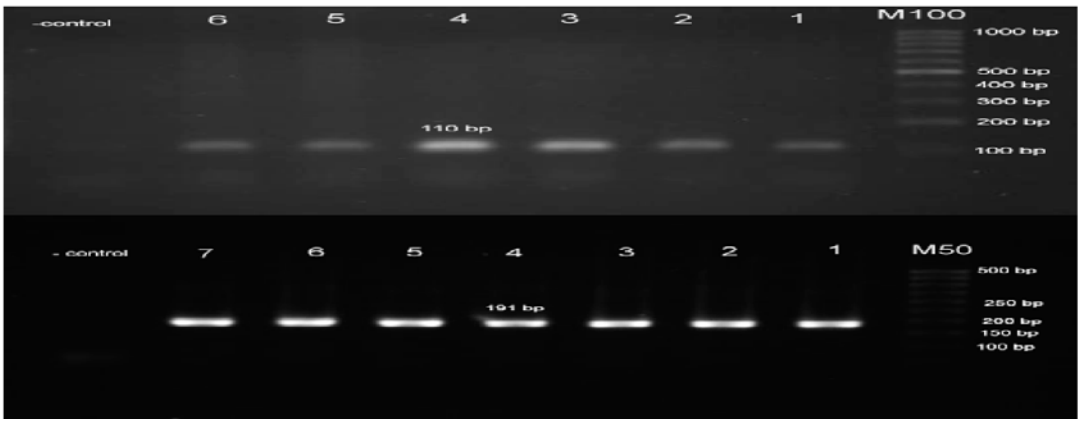
نتایج و بحث

۱- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که نمونه های پودر ماهی جمع آوری شده هیچگونه آلودگی به بقایای بافتی خوک سانان نداشتند. اما ۷۵ درصد نمونه‌های جمع‌آوری شده آلودگی به بقایای بافتی نشخوارکنندگان و ۵۵ درصد آلودگی بقایای بافتی طیور را نشان دادند. همچنین آلودگی مشترک بقایای بافتی نشخوارکنندگان و طیور در پودر ماهی ٤٥ درصد برآورد شد.



شکل۱-الکتروفورز محصولات Multiplex PCR. شماره ۱ (DNA گاو)، شماره ۲ (DNA مرغ)، شماره ۳ (DNA خوک)، **M**۱۰۰ مارکر، **C**، کنترل منفی، شماره ٤-١٦(نمونه های پودر ماهی).

۲- با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه مورد انتظار با طول ۱۱۰ جفت باز از ژنوم قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه (۲) و قطعه کنترل استاندارد با اندازه ۱۹۱ جفت باز بدست آمد(شکل ۲). از شدت نسبی باندهای قطعه الگو و کنترل استاندارد به منظور بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه تحت جیره‌های مختلف استفاده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه تغییرات معنی‌داری در اثر جایگزینی نشان ندادند.



شکل۲- محصولات حاصل از PCR توالی 18S rDNA قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه(قطعه ۱۱۰جفت بازی) و توالی فاژ لامبدا (۱۹۱ جفت بازی)

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصله نشان دهنده ضرورت آزمون های مبتنی بر PCR در استاندارد ملی برای افزایش کیفیت خوراک دام و طیور است و همچنین با توجه به سادگی و صحت بالای روش PCR رقابتی می‌توان به آسانی از آن در تعیین جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه استفاده نمود.

منابع:

1. Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero M, 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular Cellular Probes, 18: 81-87.

2. Denman SE, McSweeney CS, 2006. Development of a Real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiology Ecology, 58: 572-582.
3. Franz W, Hlfriende H, Thomas L, 2001. Quantification of mRNA expression by competitive PCR using non-homologous competitors containing a shifted restriction site. Nucleic Acids Research, Vol. 29, No. 11 e52.
4. Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Moussavi AH, Javadmanesh A, 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control, 20: 696-699.
5. Vu HL, Nguyen SHH, Russell MW, Mestecky J, 2000. A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis. Nucleic Acids Research, 28. e18.

Detect fraud and contamination of feed and rumen fungi populations based on the method of polymerase chain reaction (PCR)

Hossein mohammadi[*1], Mohammad Moradi shahrebabak[1], Mostafa Sadeghi[1]
1, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
*** Corresponding E-mail address: mohammadi37@ut.ac.ir**

Abstract
Considering the current situation and the dramatic growth, particularly genetics and molecular techniques can easily turn off a lot of violations and fraud in the food and poultry feed and can be identified and segregated. Quantitative study of populations of rumen anaerobic fungi using traditional cultivation methods for life cycle of these unique rumen microbial flora that includes two separate phases and mobile phase of colony formation is very difficult and time consuming and sometimes impossible. Today, with the introduction of molecular techniques based on DNA sequences protected recognize microbial flora and its population changes in the rumen environment in addition to simplicity is highly accurate. The aim of This study to identify possible fraud and used to identify species (ruminants, poultry and pork) in animal feed and Population Changes in rumen anaerobic fungi under different dietary methods based on polymerase chain reaction was. The survey results showed PCR-based tests can be potential contaminants detected in the feed with a high accuracy of the rumen fungi population changes be evaluated.

Keywords: animal feed, rumen fungi, polymerase chain reaction