نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۲۴، پاییز ۱۳۹۶
ص‌ص: ۳~۸

تشخیص شیرهای مختلف در شیر شتر با استفاده از روش‌های ملکولی

- **محسن فتحی نجفی** (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات و اکسن و سرم سازی رازی -شعبه شمال شرق، شرکت و آزمایشگاه دانش بنیان سورن تک‌توس مشهد- شهرک صنعتی توس
- **ریحانه تفقدی**
شرکت و آزمایشگاه دانش بنیان سورن تک‌توس مشهد- شهرک صنعتی توس
- **منصوره عزیزی**
شرکت و آزمایشگاه دانش بنیان سورن تک‌توس مشهد- شهرک صنعتی توس
- **بهجت مجیدی**
موسسه تحقیقات و اکسن و سرم سازی رازی -شعبه شمال شرق
- **فاطمه فتحی نجفی**
شرکت و آزمایشگاه دانش بنیان سورن تک‌توس مشهد- شهرک صنعتی توس

شماره تماس نویسنده مسئول: ۹۱۵۵۰۴۱۲۹۵۰
Email: najafi99@yahoo.com

چکیده:

شیر شتر به‌عنوان یک محصول غذائی و درمانی دارای جذابیت‌های مختلفی برای مصرف در درمان و پیشگیری از بیماری می‌باشد. این امر، خود می‌تواند باعث ایجاد سوء استفاده برای اختلاط انواع شیر با شیر شتر شده و اصالت آن را تحت‌تاثیر قرار دهد. در این تحقیق ابتدا با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و بررسی منابع و انجام بلاست، همترازسازی و تجزیه توالی‌های در دسترس، پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی شیر شتر، شیر گاو و شیر گوسفند طراحی گردید. ابتدا DNA انواع شیر با استفاده روش فنل/کلروفرم استخراج و پس از ارزیابی، با پرایمرهای طراحی شده مورد آزمون قرار گرفت. سپس شیر گاو و گوسفند با شیر شتر مخلوط و ارزیابی آن با PCR صورت گرفت. با توجه به نتایج حاصل مشخص شد که پرایمرهای طراحی شده ، قابلیت تفکیک انواع شیر را در بین گونه‌های مذکور دارد و در بررسی غلظت‌های مختلف شیر گاو و گوسفند در شیر شتر مشخص شد که با استفاده از روش PCR می توان به‌راحتی مقادیر کم شیر تداخلی را در شیر شتر مشخص نمود. لذا این روش، به‌عنوان یک روش سریع و مناسب برای بررسی اصالت شیر شتر می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تقلب، پرایمرهای اختصاصی، همترازسازی توالی‌ها.

Applied Animal Science Research Journal No 24 pp: 3-8

Detection of different milk in camel milk by PCR method

By: M. Fathi Najafi [1,2]*, R. Tafaghodi Elijehbaf[2], M. Azizi[2], B. Majedi[1], F. Fathi Najafi[2]
1: Razi Vaccine and Serum Research Institute-Mashhad-Iran
2: Soren Tech Toos laboratory-Toos Industrial Zone- Mashhad-Iran

Camel milk is a very important drink with different increasing medicinal and pharmaceutical applications. According to its low accessibility and yield of production, there is a high potent field for adulteration in this valuable drink. So it is necessary to develop rapid, cost effective and sensitive methods to identify milk type. Here we develop a polymerase chain reaction (PCR) method on the basis of designed specific primers. The designed primers were confirmed by the primer blast (NCBI). DNA of different animal milks were isolated by phenol/chloroform method. To determine the identification ability of designed method, different type of milk were mixed with camel milk and the PCR test was accomplished. The results show that designed primers have the ability to detect camel milk and differentiate milk types. This technique is sensitive method for distinguish of any milk adulteration in camel milk.

Key words: Adulteration, Sequence alignment, Specific primers.

مقدمه

شیر شتر به‌عنوان یک نوشیدنی طبیعی با خواص غذائی و درمانی، توجه افراد مختلفی را برای به‌کارگیری آن در زمینه‌های مختلف به‌خود جلب نموده است(Shabo, *et al.*, 2005, Sboui, *et al.*, 2010). کاربردها و فواید این ماده در درمان و پیشگیری از بیماری‌های مختلف (Mihic, *et al.*, 2016; Zibaee, *et al.*, 2015; Mohamed, *et al.*, 2015; Al-Ayadhi and Elamin, 2013; Mohamad, *et al.*, 2009). سبب ایجاد توجه درزمینه‌های تحقیقاتی و دارویی شده است. علاوه بر این، اقبال عمومی ایجاد شده ناشی از آگاهی مردم از فواید این نوشیدنی، سبب پیدایش زمینه‌های تقلب در بین برخی افراد سودجو گردیده است.

به‌کارگیری بخش‌های اختصاصی DNA یک موجود برای شناسائی آن و یا حضور آن در ترکیبات دیگر یکی از متداول‌ترین روش‌های تشخیص می‌باشد. در روش ملکولی، استفاده از PCR می‌تواند حضور و یا عدم حضور آلودگی احتمالی را اعلام نماید. این روش، شامل استخراج DNA ژنومی در دو مرحله، تخریب سلول به‌منظور آزادسازی DNA و جداسازی ناخالصی‌ها از محلول DNA می‌باشد. برای این‌کار ابتدا بافت کاملا یکنواخت شده و با بافر TE مخلوط می‌شود و سپس به مخلوط پروتئیناز K[1] و سدیم دو دسیل سولفات[2] اضافه شده و در ۳۷ درجه سلسیوس

[1] Proteinase K: برای دناتوره کردن پروتئین‌ها از آنزیم پروتئیناز K **که** نقش پروتئین‌زدایی دارد، استفاده می‌شود.

[2] برای حذف غشاء سلول‌های جانوری از ترکیبات دترجنت مثل SDS (**سدیم دو دسیل سولفات**) استفاده می‌شود، که با پایین آوردن کشش سطحی، غشاء سلول و هسته پاره می‌شود. این ترکیبات بافر لیزکننده هستند. برای جداسازی DNA، دناتوره شدن و نابودی پروتئین‌ها و سایر ترکیبات موجود در سلول از ترکیبات آلی **مانند، فنل** ، کلروفرم ، ایزوآمیل‌الکل به‌کار می‌رود.

برای مدت ۲۰ دقیقه جهت لیز سلولی قرار می‌گیرد. پس از لیز سلولی، DNA با استفاده از فنل اشباع و کلرفرم استخراج خواهد شد. سپس DNA با رسوب‌دهی دو حجم اتانول ۱۰۰ درصد سرد، استخراج ، شستشو و برای ادامه کار مورد استفاده قرار خواهدگرفت.

در این تحقیق با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حیوانات مورد بررسی، احتمال حضور شیرهای مختلف در شیر شتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه انواع DNA

چهت ارزیابی حضور شیرهای مختلف در شیر شتر، سه نوع شیر شامل شیر گاو ، شیر گوسفند و شیر شتر از منابع مورد تایید تهیه گردید. ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر شیر را با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده و از رسوب به‌دست آمده با استفاده از روش فنل و کلروفرم، DNA موجود استخراج گردید. DNA به‌دست آمده با استفاده از آگارز الکتروفورز بررسی و مورد تایید قرار گرفت.

تهیه مخلوط شیرها و استخراج DNA

ابتدا شیر گاو و گوسفند با نسبت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد به شیر شتر اضافه شده و سپس DNA شیرهای تهیه شده با نسبت‌های مختلف بر اساس روش استخراجی بالا تهیه و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

انجام مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی پرایمرهای اختصاصی

ابتدا، از طریق سایتNCBI،(https://www.ncbi.nlm.nih.gov)، توالی ژنی سیتوکروم(cytB)B گرفته شد و همترازسازی توالی‌ها[3] انجام شد و براساس نتایج همترازسازی و نقاط اختلاف توالی‌ها، پرایمرهای مناسب طراحی گردید و نتایج بلاست پرایمرهای طراحی شده نشان داد که این پرایمرهای طراحی شده، قابلیت شناسایی انواع مختلف نمونه‌های شیر و تفکیک آن‌ها را دارد. در نهایت توالی پرایمرهای طراحی شده جهت سنتز به شرکت سیناکلون ایران ارسال گردید و پرایمر مورد نیاز سنتز شد.

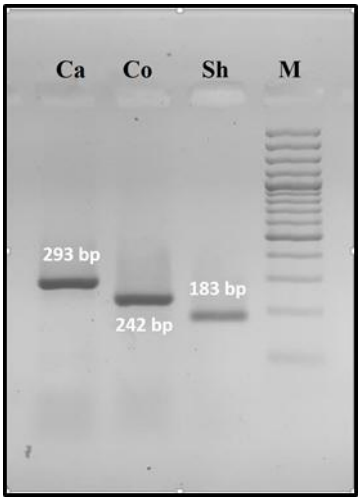
انجام PCR

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مخلوط PCR با استفاده از کیت آماده برای ۲۰ میکرولیتر تهیه و عملیات PCR به وسیله دستگاه ترموسایکلر Eppendorf و با سیکل حرارتی طراحی شده برای تهیه قطعه موردنظر انجام گردید. پس از انجام PCR، محصول تهیه شده به‌وسیله الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام و پس از اتمام الکتروفورز، ژل به‌وسیله دستگاه ترانس لومیناتور UV مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در استخراج DNA انجام شده نمونه‌های مورد استفاده پس از تایید به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. در این آزمون پرایمرهای تهیه شده دارای اندازه‌های مختلف شامل قطعه گاوی ۲۴۲ باز، قطعه گوسفندی۱۸۳ باز و قطعه شتر۲۹۳ باز بودند (شکل۱). در این ژل اندازه باندهای قابل تشخیص برای نمونه‌های مختلف آماده است. لذا براساس اختلاف باندهای موجود و تطابق هرجفت پرایمر می‌توان برای ارزیابی احتمال حضور شیرهای مختلف در شیر شتر مورد استفاده قرار گیرد.

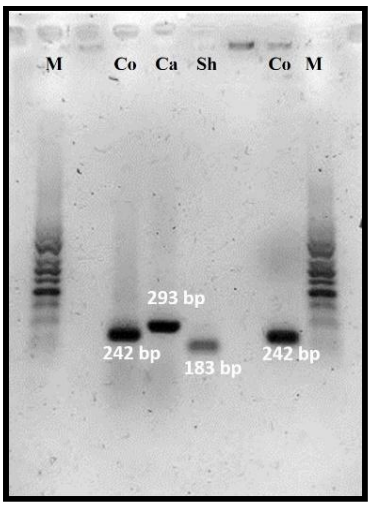
[3] *Sequence alignment*



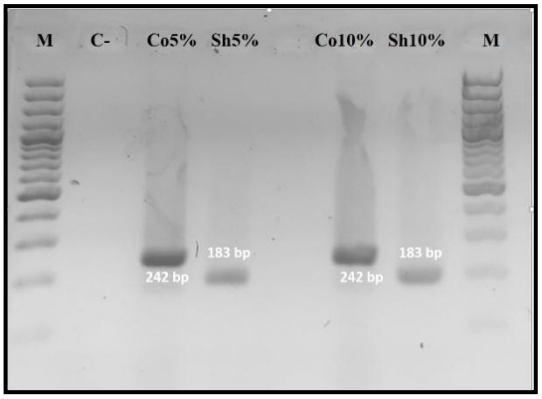
شکل ۱: ژل آگاروز ۱درصد همراه با PCR نمونه مثبت گاو، شتر، گوسفند.

- M=marker،Sh=sheep ،Ca=Camel ،Co=Cow) (100bp

براساس بررسی انجام شده از تداخل شیرهای مختلف شامل ۵، ۱۰ و۲۰ درصد شیر گاو و همین نسبت شیر گوسفند مخلوط با شیر شتر و استخراج DNA همراه با PCRهای مختلف، مشخص شد، پرایمرهای مورد استفاده قادر هستند با روش استخراجی DNA از شیر، تداخل دو نوع شیر گاو و گوسفند را در شیر شتر تشخیص دهند (شکل۲ و ۳).



شکل ۲: نتیجه PCR از شیر مخلوط حاوی شیر گاو، شیر شتر و شیرگوسفند. همراه با مارکر



شکل ۳: نتیجه PCR از شیر شتر مخلوط با ۵ و ۱۰ درصد شیر گاو و شیر گوسفند

بحث

در راستای پیشگیری از بروز تقلبات مخلوط مواد با هم، روش‌های مختلفی جهت شناسایی و تعیین کیفیت این مواد با ارزش مخلط با ترکیبات کم ارزش‌تر روش‌های مختلفی طراحی و ارائه شده است (Mabood, *et al*., 2017; Agrawal, *et al*., 2011; Ke, *et al*., 2016; Lopez-Calleja, *et al*., 2005). در این زمینه،استفاده از روش‌های سرولوژی، کروماتوگرافی و ملکولی می‌تواند کاربردهای مختلفی داشته باشد (Dvorak, *et al*., 2016; Boughattas, 2015; Ren, *et al*., 2014; Pizzano and Salimei, 2014; Dubey and Jones, 2014; Hurley, *et al*., 2004; Golinelli, *et al*., 2014; Rodrigues, *et a*l., 2012).

به‌کارگیری بخش‌های اختصاصی DNA یک موجود برای شناسائی آن و یا حضور آن در ترکیبات دیگر یکی از متداول‌ترین روش‌های تشخیص می‌باشد. در یک تحقیق جهت تهیه استانداردDNA، بافت حیوانات مختلف شامل شتر، گاو، گوسفند، تک‌سم (اسب/ الاغ) استخراج شد (Sambrook, Fritschi and Maniatis, 1989).

این روش برای بررسی کنونی نیز به‌کار گرفته شد و نتایج حاصل نشان داد که در صورت استخراج مناسب DNA از شیر شتر و انجام بررسی ملکولی به‌طور اختصاصی می‌توان نسبت به تایید حضور و یا عدم حضور شیر سایر دام‌ها در مخلوط اظهارنظر نمود.

منابع

Agrawal, R. P., Sharma, P. Gafoorunissa, S. J. Ibrahim, S. A. Shah, B. Shukla, D. K. and Kaur, T. (2011). Effect of camel milk on glucose metabolism in adults with normal glucose tolerance and type 2 diabetes in Raica community: a crossover study. Acta Bio-medical, 82:181-6.

Al-Ayadhi, L. Y. and Elamin, N. E. (2013). Camel milk as a potential therapy as an antioxidant in autism spectrum disorder (ASD). *Evidence-Based* Complementary *and Alternative Medicine*, 602834. 8 pages.

Boughattas, S. (2015). Commentary on "Detection of toxoplasma gondii in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran". Front Microbiol, 6: 215.

Dubey, J. P. and Jones, J. L. (2014). Comments on "detection of toxoplasma gondii in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran". Foodborne Pathogens and Disease, 11: 500-1.

Dvorak, L., Mlcek, J. and Sustova, K. (2016). Comparison of FT-NIR spectroscopy and ELISA for Detection of adulteration of goat cheeses with cow's milk. Journal AOAC Intenational, 99: 180-6.

Golinelli, L. P., Carvalho, A. C., Casaes, R. S., Lopes, C. S., Deliza, R., Paschoalin, V. M. and Silva, J. T. (2014). Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. Journal Dairy Science, 97:6693-9.

Hurley, I. P., Coleman, R. C., Ireland, H. E. and Williams, J. H. (20040. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. Journal Dairy Science, 87: 543-9.

Ke, X., Zhang, J. Lai, S. Chen, Q. Zhang, Y. Jiang, Y. Mo, W. and Ren, Y. (2016). Quantitative analysis of cow whole milk and whey powder adulteration percentage in goat and sheep milk products by isotopic dilution-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 409: 213–224.

Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I. Fajardo, V. Martin, I. Hernandez, P. E.,Garcia, T. and Martin, R. (2005). Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. Journal Dairy Science, 88:3115-20.

Mabood, F., Jabeen, F. Ahmed, M. Hussain, J. Al Mashaykhi, S. A. Al Rubaiey, Z. M., Farooq, S., Boque, R. Ali, L. Hussain, Z. Al-Harrasi, A. Khan, A. L. Naureen, Z. Idrees, M. and Manzoor, S. 2017. Development of new NIR-spectroscopy method combined with multivariate analysis for detection of adulteration in camel milk with goat milk. Food Chemistry, 221:746-750.

Mihic, T., Rainkie, D. Wilby, K. J. and Pawluk, S. A. (20160. The therapeutic effects of camel milk: A Systematic review of animal and human trials. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative MedicineJ, 21:NP110-26.

Mohamad, R. H., Zekry, Z. K. Al-Mehdar, H. A. Salama, O. El-Shaieb, S. E. El-Basmy, A. A. Al-said, M. G. and Sharawy, S. M. (2009). Camel milk as an adjuvant therapy for the treatment of type 1 diabetes: verification of a traditional ethnomedical practice. Journal of Medicinal Food, 12: 461-5.

Mohamed, W. A., Schaalan, M. F.and El-Abhar, H. S. (2015). Camel milk: potential utility as an adjunctive therapy to Peg-IFN/RBV in HCV-4 infected patients in Egypt. Nutrition and Cancer, 67:1305-13.

Pizzano, R. and Salimei, E. (2014). Isoelectric focusing and ELISA for detecting adulteration of donkey milk with cow milk. Journal Agricultural Food Chemistry, 62:5853-8.

Ren, Q. R., Zhang, H. Guo, H. Y. Jiang, L. Tian, M. and Ren, F. Z. (2014). Detection of cow milk adulteration in yak milk by ELISA. Journal Dairy Science, 97: 6000-6.

Rodrigues, N. P., Givisiez, P. E. Queiroga, R. C. Azevedo, P. S. Gebreyes, W. A. and Oliveira, C. J. (2012). Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. Journal Dairy Science, 95: 2749-52.

Sboui, A., Khorchani, T. Djegham, M. Agrebi, A. Elhatmi, H. and Belhadj, O. (2010). Anti-diabetic effect of camel milk in alloxan-induced diabetic dogs: a dose-response. experiment. Journal Animal Physiology Animal Nutrion (Berl), 94:540-6.

Sambrook J, Fritschi, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning:a laboratorymanual, cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shabo, Y., Barzel, R. Margoulis, M. and Yagil, R. (2005). Camel milk for food allergies in children. Israil Mededical Assocition Journal, 7:796-8.

Zibaee, S., Hosseini, S. M. Yousefi, M. Taghipour, A. Kiani, M. A. and Noras, M. R. (2015). Nutritional and therapeutic characteristics of camel milk in children: A Systematic Review. Electron Physician, 7; 1523-8.