مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
مجلد 42 العدد 3(2026): 43-56

Damascus University Journal for Agricultural Sciences Vol 42-No.3 (2026): 43-56

استخدام طريقة الـPCR-RFLP للمورثة الميتوكوندرية 12S rRNA لتحديد هوية لحوم نوعي الدجاج والديك الرومي

بنان أحمد بشير الشيخ[1*]، عبد الحكيم عزيزية[2]، عصام قاسم[3]

1- باحث مساعد، مخبر الحيويات الطبية والحيوانية، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، سوريا.
banan981.alshaikh@damascusuniversity.edu.sy
2- أستاذ، جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم علوم الأغذية.
3- أستاذ، جامعة دمشق، كلية العلوم، قسم العلوم الحيوانية.

الملخص:

هدف هذا البحث إلى تحديد هوية لحوم نوعي الدجاج والديك الرومي من خلال تطبيق تقنية قطع ناتج تضخيم الدنا بأنزيمات قطع محددة(PCR-RFLP) والتحقق من مصداقية اللحوم النيئة والمطبوخة الموجودة في الاسواق السورية. جمعت ثمان عينات من اللحوم النيئة والمطبوخة المسماة على أنها لحم دجاج وثمان عينات من اللحوم النيئة والمطبوخة المسماة على أنها ديك رومي تم استخلاص الدنا الكلي وتضخيم دنا جزء من المورثة الميتوكوندرية mt12S rDNA باستخدام مرئسة عامة وأعطت عصابة بطول 490 bp تقريباً. تم معاملة نواتج التضخيم بأنزيمات قطع محددة من النمط الثاني وهي: ApoI، AluI، HhaI، MspI، BspTI ومن ثم مقارنة أنماط القطع المحددة الخاصة بالعينات مع أنماط القطع المحدد المميزة لعينات مرجعية خاصة بكل نوع من أنواع اللحوم كشاهد ايجابي.

أظهرت النتائج أن كل العينات المسماة على أنها لحم دجاج والمسماة على أنها لحم ديك رومي هي لحم دجاج. تعد تقنية PCR-RLFP رخيصة نسبياً ودقيقة وهي حساسة وسريعة مما يؤهلها كتقنية هامة وعملية لتحديد هوية ومنشأ أنواع اللحوم واستثمارها في الاختبارات الروتينية.

الكلمات المفتاحية: دجاج، ديك رومي، PCR-RFLP، المورثة الميتوكوندرية 12SrRNA.

تاريخ الإيداع: 2024/02/17
تاريخ القبول: 2024/07/08

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

Using PCR-RFLP Assay of mt 12S rRNA Gene to Identify Chicken and Turkey Meat Species

Banan Ahmad Basheer Alshaikh[1*], Abdulhakim Azizieh[2], Issam Kassem[3]
1- Research Assistance, Biomedical and Animals Lab, National Commission for Biotechnology, Syria. banan981.alshaikh@damascusuniversity.edu.sy
2-Professor, Damascus University, Faculty of Agriculture, Food Science Department.
3-Professor, Damascus University, Faculty of Science, Zoology Department.

Received:17/02/2024
Accepted:08/07/2024

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

This research aimed to identify chicken and turkey meat species by applying PCR-RFLP technique and to evaluate the conformity of raw and cooked meats in the Syrian markets. Eight samples of raw and cooked meat samples named as chicken and eight samples of raw and cooked meat samples named as turkey were randomly collected.

Total DNA was extracted, and a segment of mt 12SrDNA gene was amplified using universal primers. All samples yielded one band of approximate length ~490bp. The amplification products were digested by applying five restriction enzymes of type II: ApoI, AluI, HhaI, MspI & BspTI. The restriction patterns of the samples were compared with restriction patterns of reference samples served as positive controls.

The results show that all samples named as chicken meat and all samples named as turkey meat were chicken.

PCR-RFLP technique has been, therefore, demonstrated to be a sensitive, highly reproducible, and comparatively less costly technique for meat source identification, so we can invest this technique in the routine tests.

Keywords: Chicken, Turkey, PCR-RFLP, mt 12SrRNA gene.

1-المقدمة Introduction:

يعد لحم الدجاج والديك الرومي من اللحوم البيضاء ذات مصدر رائع للبروتين قليل الدهون الذي يساعد على نمو العضلات وتطورها وهو أمر مرغوب فيه من قبل المستهلكين (Maiorano et al, 2011, 1620) ولكن تكاليف تربية الديك الرومي أعلى عدة مرات من تلك الخاصة بالدجاج مما يفسر السعر الأعلى للحم الديك الرومي مقارنة بلحم الدجاج .(Islam et al, 2021, 1022). يصنف الدجاج تحت صف الطيور (Class: Aves) رتبة الدجاج (Order: alliformes) عائلة الفزانيات (Family: Phasiandae) جنس الديك (Genus: Gallus) نوع الدجاج (Species: Gallus gallus) .

ويصنف الديك الرومي تحت صف الطيور-(Class: Aves) رتبة الدجاج (Order: Galliformes) عائلة الفزانيات :(Family: Phasiandae) جنس (Genus: Meleagris) ويضم خمسة أنواع Species ثلاث منها منقرضة والنوعين الباقيين هما: نوع الديك الرومي البري (Meleagris gallopavo) ونوع الديك الرومي ذو العيينات.(Meleagris ocellata)

يتم غش لحم الديك الرومي بلحم الدجاج الأرخص ثمناً بدافع اقتصادي وذلك لتحقيق المزيد من المكاسب المادية. من الصعب للغاية اكتشاف الغش في لحوم الدجاج والديك الرومي ومنتجاتها بالعين المجردة بسبب تشابهها في المظهر وبخاصة عند إزالة الرأس والقدمين والأجنحة مما يعيق التحديد البصري للمنتج (Drummond et al, 2013, 131)، وكذلك المعاملات الميكانيكية والحرارية التي تتم خلال تصنيع اللحوم، علاوة على ذلك، لا توفر بطاقات البيان ضمانات كافية في ظل الطرائق المعتمدة لتحديد نوع اللحوم (He et al, 2018, 651).

تعد حماية المستهلكين من الممارسات السيئة لغش اللحوم ومن منتجات لحوم ذات بطاقات بيان مضللةٍ أو خاطئة، دائماً من القضايا المهمة التي تحث السلطات القانونية والباحثين على تطوير تقنيات مختلفة لكشف الغش وضمان جودة المنتجات (Islam et al, 2021, 1022).

الطرائق التحليلية المستخدمة لتحديد الأنواع الموجودة في اللحوم ومنتجاتها تعتمد في نطاق واسع على دراسة البروتين أو الحمض النووي (Aida et al, 2015, 47). لقد بينت الدراسات السابقة أن التقنيات المعتمدة على الدنا والتي يتم تطويرها باستمرار هي الأكثر كفاءة في تحديد الأنواع وفي التغلّب على عيوب الطرائق التقليدية. إذ يتميز الحمض النووي بالعديد من المزايا مقارنة مع البروتين إذ أنه أكثر ثباتاً عند درجات الحرارة العالية والضغط المرتفع وكذلك عند اجراء المعاملات الميكانيكية اللازمة خلال مراحل تصنيع اللحوم ومنتجاتها، كما أن تركيبه ثابت في جميع أنسجة الجسم وله قدرة كبيرة على تحديد النوع الحيواني وخصوصاً عند استخدام أنواع من اللحوم متقاربة وراثياً (Mane et al, 2012, 246)؛ (Xu et al, 2018, 41)؛ (Mandali et al, 2018, 380)؛ (Ballin, 2010, 577)؛ (Sentandreu et al, 2014, 19)؛ (Lockely&Bradsley, 2000, 67)؛ (Kumar et al, 2015, 1340).

تشمل التقنيات المعتمدة على تفاعل البوليميراز التسلسلي للدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) والمستخدمة لتحديد الانواع الحيوانية العديد من الطرائق منها: Specific PCR، Multiplex PCR، PCR-RAPD، PCR-RFLP، Real-Time PCR و DNA sequencing (Fajardo et al, 2010, 408)؛ (Li et al, 2020, 2256)؛ (Saez et al, 2004, 659)؛ (Kumar et al, 2015, 1340)؛ (Girish et al, 2004, 551)؛ (Chung et al, 2000, 379)؛ (Colombo et al, 2002, 291).

تتكون تقنية هضم الدنا المضخم بأنزيمات القطع المحددة Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) المستخدمة للتمييز بين أنواع الحيوانات من خطوتين، يتم في الخطوة الأولى تضخيم المنطقة المحفوظة من تسلسل الحمض النووي بواسطة الـ PCR ويتم في الخطوة الثانية الهضم اللاحق لمنتج التضخيم باستخدام أنزيمات التقطيع التي تكشف عن الاختلافات بين الأنواع (Patris et al, 2000, 369). يتم استخدام الدنا الميتوكوندري بشكل تفضيلي لتحديد الأنواع للعديد من الأسباب، إذ يوجد الدنا الميتوكوندري بآلاف النسخ في الخلية مقارنة بنسخة واحدة للدنا النووي مما يزيد من احتمال اكتشاف تسلسل معين بالإضافة

إلى أنه أكثر مقاومة للتفكك بسبب شكله الدائري مما يزيد من فرصة تضخيم مناطق الدنا الميتوكوندري غير التالفة (Bottero& Dalmass, 2011, 34)؛(Fajardo et al, 2010, 408)؛(Kumar et al, 2015, 1340)؛(Saez et al, 2004, 659)؛(Rashid et al, 2015, 1031)؛(Galal-Khallaf, 2021, 674). فالميتوكوندريا هي عضيات شبه خلوية تحتوي على جينوم خارج الصبغيات منفصل ومتميز عن الجينوم النووي وتلعب الميتوكوندريا دوراً مهماً في عملية الفسفسرة المؤكسدة لانتاج ATP ويحتوي الحمض النووي الميتوكوندري على 13 جيناً يشفّر 13 بولي ببتيد و22 tRNA و2 rRNA وتوّرث الميتوكوندريا من الأم لذلك فهو يستخدم في تقصي علاقة التطور بين المجموعات و الانواع الفرعية والانواع (Shen et al, 2002, 129) ولقد تم تطبيق هذه التقنية بنجاح في العديد من الأبحاث وذلك باستهداف مناطق مختلفة من الدنا الميتوكوندري مثل Cyt b (Branciari et al, 2000, 390)، 16SrRNA (Borgo et al, 1996, 1) ، 12S rRNA (Girish et al, 2005, 107).

تعد مورثة الدنا الميتكوندري الريباسي mt 12SrRNA أحد المورثات الأكثر استخداماً لتحديد هوية أنواع اللحوم (Girish et al, 2005, 107)؛ (Wang et al, 2010, 265) ؛ (Galal-Khallaf, 2021, 145062).

تم في هذه الدراسة استخدام طريقة الـ PCR-RFLP لاستهداف جزء من هذه المورثة الميتوكوندرية لتحديد لحوم نوعي الدجاج والديك الرومي من عينات اللحوم النيئة والمطبوخة.

2-مواد البحث وطرائقه Materials and Methods:

جمع العينات:

تم جمع عينات دم من الطيور الحية لكل من نوع الدجاج (gallus gallus) ونوع الديك الرومي البري (Meleagris gallopavo) ونوع الديك الرومي ذو العيينات (Meleagris ocellata) بعد التأكد من النوع الحيواني، واستخدامها كعينات مرجعية إيجابية. جمعت ثمان عينات من كل من لحوم نوعي الدجاج والديك الرومي (لحم نيئ، لحم مفروم، شقف، كباب) وبثلاث مكررات من أسواق مختلفة في دمشق (من محلات بيع مختلفة) في الشهر الثالث من العام 2021 وفق الجدول رقم (1). كانت العينات عبارة عن لحوم تجارية بدون بطاقة بيان حيث تم تدوين المعلومات الخاصة بها حسب معلومات البائع وتم أخذ صور رقمية لتوثيق المنتج.

وضعت كل عينة بكيس بلاستيكي مغلق بسحاب بشكل منفصل لتجنب حدوث التلوث الاعتراضي بين العينات وأرفقت بالمعلومات الخاصة لكل منها ثم أرسلت إلى المخبر مباشرة ضمن حافظة تبريد +4 °م.

الجدول رقم (1): يبين عينات الدم المرجعية وعينات اللحوم المدروسة

رمز العينة	العينة	عدد العينات	عدد المكررات
G.g	دم دجاج (عينة مرجعية)	1	3
M.g	دم حبش بري (عينة مرجعية)	1	3
M.o	دم حبش ذو العيينات (عينة مرجعية)	1	3
A	لحم نيئ دجاج	2	3
B	لحم مفروم دجاج	2	3
C	شقف دجاج	2	3
D	كباب دجاج	2	3
E	لحم نيئ حبش	2	3
F	لحم مفروم حبش	2	3
G	شقف حبش	2	3
H	كباب حبش	2	3

تحضير العينات:

تم سحب عينات الدم من طيور الدجاج والديك الرومي البالغة كعينات مرجعية ايجابية بواسطة عبوة معقمة مفرغة من الهواء ووضعت كل عينة في انبوب جمع دم يحتوي على مادة مميعة للدم (K_2EDTA)، ووزعت الى أنابيب ابندورف معقمة 1.5 مل بمقدار 50 ميكروليتر دم في كل أنبوب، وحفظت العينات عند الدرجة −20 °م لحين اجراء الاختبار.

أما عينات اللحم فقد أخذت عينة بوزن 10 غرام تقريباً، من أماكن مختلفة من العينة لضمان تمثيل العينة بشكل حقيقي، وباستخدام مشرط عقيم، وضعت كل عينة في جفنة سيراميك معقمة مسبقاً في فرن بدرجة حرارة 155°م لمدة ثلاث ساعات، لضمان عدم التلوث الاعتراضي بالدنا. سحقت العينات بعد غمرها بالآزوت السائل بشكل تام، وأخذ من كل منها عينة بوزن 25 ملغ (Alshaikh et al, 2015, 709).

استخلاص الدنا:

عزل الدنا الكلي من كل عينة باستخدام طاقم عزل معتمد (QIAamp Blood MiniKit) من شركة كياجين (Qiagen, Germany)، واتبعت الإجراءات الخاصة بعزل الدنا من الدم للعينات المرجعية (عينات الدم). وأُتبعت أيضاً الإجراءات الخاصة بعزل الدنا من الأنسجة حسب تعليمات الشركة الصانعة مع بعض التعديلات: تقليل كمية الدم المأخوذة من 1000 ميكروليتر لـ 50 ميكروليتر، زيادة تركيز بروتيناز K حتى 6 ميكروغرام/ميكروليتر، زيادة فترة الحضن بحيث أصبحت طوال الليل، ومضاعفة كمية المحلول الموقي AL Buffer المضافة (Alshaikh et al, 2015, 709) تم قياس كمية الدنا على طول الموجة 260 نانومتر واعتمدت نسبة الامتصاص 260/280 لتعيين جودة الدنا (~1.7<). حُفظت عينات الدنا في −20 °م للاستخدام اللاحق.

تضخيم الدنا:

تم استخدام مرئستين عامتين Universal primers (DNA alpha, Canada) لتضخيم المورثة mt 12S rDNA وهما:

Forward Primer: 5`- CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT -3`
Reverse Primer: 5`- GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT -3`

(Kosher et al, 1989, 6196). استخدمت أنابيب PCR 0.2 مل في عملية تضخيم الدنا يحتوي كل منها على: 12.5 µl المزيج الرئيسي master mix (GeneDirex, Malaysia)، 3 µl من كل مرئسة بتركيز 8 µM ، 5-15 µl دنا معزولة بحيث تكون كمية الدنا الكلية في التفاعل 500 نانوغرام (Alshaik et al, 2015, 709) وأكمل الحجم إلى 50 µl بإضافة ماء خاص بالبيولوجيا الجزيئية خال من الإنزيمات الهاضمة للدنا والرنا (Roth, Germany). استخدم المدور الحراري من الطراز Mastercycler (Eppendorf, Germany) وفق البرنامج الحراري: 5 دقائق بدرجة حرارة 94° م للتمسخ الأولي initial denaturation, ثم أتبعت بـ 40 دورة تضخيم: 45 ثانية بدرجة حرارة 94°م, 45 ثانية بدرجة حرارة 60°م, 1 دقيقة بدرجة حرارة 72° م. وأخيراً 10 دقائق بدرجة حرارة 72°م للاستطالة النهائية final extension (Girish et al, 2004, 551). رحلت نواتج التضخيم على هلامة آغاروز 2% وبوجود صبغة بروماید الایثیدیوم.

هضم ناتج التضخيم بأنزيمات القطع المحددة:

أُعتمدت أنزيمات قطع محددة هي: ApoI، AluI، HhaI، MspI، BspTI اعتماداً على الدراسات المرجعية وعلى دراسة معلوماتية حيوية من خلال دراسة السلاسل المعروضة في قائمة البيانات (Database) في البنك الوراثي (Genebank) للمورثة الميتوكوندرية 12S rRNA الخاصة بكل نوع من الأنواع المدروسة لتحديد أنزيمات القطع المناسبة (Girish et al, 2005, 107)؛ (Alshaikh et al, 2015, 709). إذ يتيح إجراء القطع بإنزيم محدد وإعطاء عصابات بأطوال معلومة تحديد هوية اللحوم الموجودة في العينات المدروسة. أُستخدم كل من سلمي الدنا المئوي الأساس 100bp DNA Ladder (M1) (Biolab, England) والخمسيني الأساس 50bp DNA Ladder (M2) (Fermentase, Canada) لتحديد أطول العصابات الناتجة بشكل تقريبي.

عوملت نواتج التضخيم بإنزيمات القطع المحددة الواردة في الجدول (2) (Fermentase, Canada) وباستخدام محاليل موقية مناسبة وفق تعليمات الشركة المصنعة مع إجراء بعض التعديل (Alshaikh et al, 2015,709) وذلك ضمن أنابيب 0.2 مل عقيمة، حضنت على درجة الحرارة 37 °م طوال الليل، رُحّلت منتجات الهضم باستخدام هلامة عديد اكريلاميد 8% (29:1).

الجدول (2): إنزيمات القطع المحددة المستخدمة:

رقم الإنزيم	أنزيم القطع	مكان القطع	المحلول الموقي الأمثل	درجة الحرارة المثلى
1	ApoI (XapI)	R A⇩TTY	Tango 1X	37م°
2	AluI	AG CT⇩	Tango 1X	37م°
3	HhaI	GCG C ⇩	Tango 1X	37م°
4	MspI (HpaII)	C CG⇩	Tango 1X	37م°
5	BspTI (AfIII)	C T⇩TAAG	Orange 1X	37م°

تمثل R الأساس G أو A.

تمثل Y الأساس C أو T.

يتم تحديد نوع اللحوم الداخلة في عينات اللحوم المدروسة من خلال مقارنة نتائج رحلان نواتج هضم ناتج تضخيم المورثة mt 12S rDNA (نمط قطع restriction pattern) الناجمة عن عمل أنزيمات القطع المحددة لهذه العينات مع طرز القطع الخاصة بالعينات المرجعية لنوع الدجاج ونوعي الديك الرومي.

3-النتائج والمناقشة Results and Discussion:

- استخلاص الدنا:

تكون كريات الدم الحمراء والبيضاء منوّاة عند الطيور وذلك لتكون قادرة على الطيران وتحمل الاجهاد لفترات طويلة ولذلك كانت كمية الدم المأخوذة للاستخلاص 50 ميكروليتر بدلاً من 1000 ميكروليتر كافية للحصول على قيم عزل جيدة للدنا. بينما أخذت عينات اللحوم من أماكن مختلفة من العينة لضمان تمثيل كامل العينة بشكل حقيقي. كانت قيم عزل الدنا في كل العينات جيدة إذ لا تؤثر معاملات الطبخ على كفاءة استخلاص الحمض النووي والكشف اللاحق عن الأنواع الحيوانية عن طريق تفاعل الـ PCR وهذا يتفق مع ماذكره (Alshaikh et al, 2015, 709)؛ (Matsunage et al, 1998, 379)؛ (Piskata et al, 2019, 1188)؛ (Salakar et al, 2012, 40)؛ (Sreenivasan&Viljoen, 2021, 2699). إذ يسمح وجود الدنا الميتوكوندري بآلاف النسخ في الخلية بالحفاظ على جزء كاف من النسخ بحالة جيدة عند تعريض العينة لظروف تصنيع قاسية (Girish et al, 2004, 551)؛ (Galal-Khallaf, 2021, 145062). تراوحت كمية الدنا المستخلصة من العينات المدروسة ضمن المجال 230 -100 ميكروغرام/مل وكانت نقاوتها بين 1.9-1.7.

- تضخيم جزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA:

تحوي سلسلة الدنا الميتوكوندري على مناطق مصانة (conserved region) في العديد من الحيوانات لترتبطا بمنطقتين مصانتين وتضخما المنطقة الفاصلة والمتنوعة من تلك المورثة لدى الأنواع المتعددة من الحيوانات (Kosher et al, 1989, 6196)؛ (Parakash et al, 2000, 1542).

يضخم زوج المرئسات المستخدمة في هذه الدراسة جزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA في جميع أنواع لحوم الحيوانات لتعطي العصابة ذات الطول التقريبي 490 bp مما يشير الى موثوقية المرئسات المستخدمة في هذه الدراسة (Girish et al, 2004, 551)؛ (Cahyadi et al, 2020, 628)؛ (Galal-Khallaf, 2021, 145062)؛ (Alshaikh et al, 2015, 709)؛ (Islam et al, 2021, 1022).

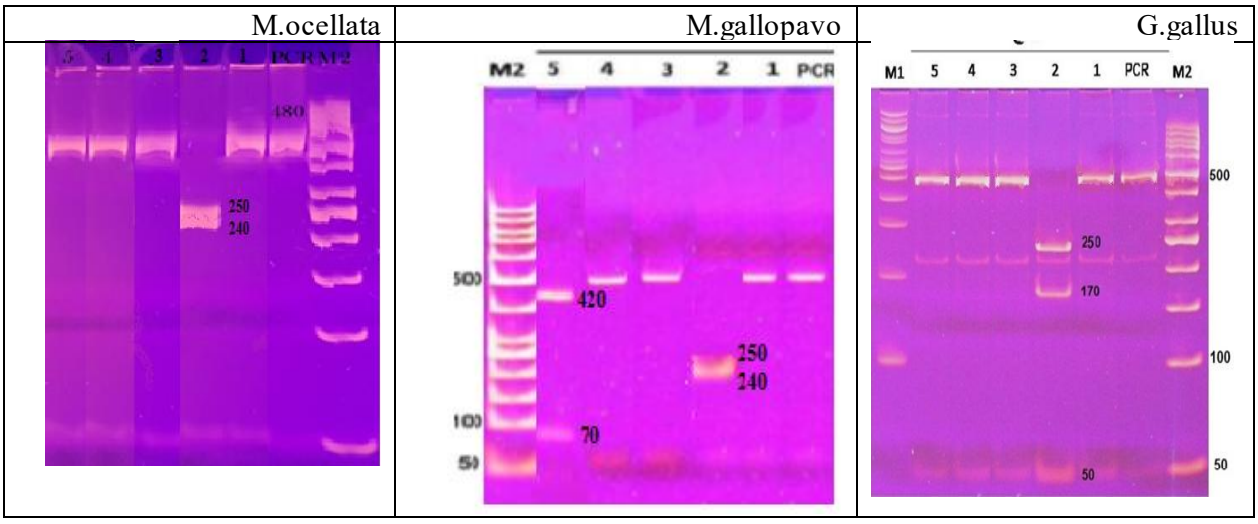
أعطت كل العينات (المرجعية والمدروسة) عصابة واحدة بطول تقريبي 490 bp وهذا يعني نجاح عملية التضخيم، وهذا ما يظهر على طول البئر PCR على الهلامة في الشكل (1 و2) وهذا يتوافق مع نتائج (Alshaikh et al, 2015, 709)؛ (Galal-Khallaf, 2021, 145062).

لم تؤثر المعالجة الفيزيائية والحرارية للعينات أثناء تصنيع منتجات اللحوم على تضخيم الدنا حيث بينت الدراسات السابقة أن درجات الحرارة العالية التي تصل حتى 160 °م لم تؤثر على استقرار الحمض النووي الريبي الميتوكوندري وبالتالي يمكن اعتبار المورثة الهدف في هذه الدراسة mt 12SrRNA كمؤشر حيوي للكشف عن اللحوم في منتجات اللحوم المصنعة (Alshaikh et al, 2015, 709؛ (Lakzadeh et al, 2013, 249)؛ (Cahaydi et al, 2020, 628).

نتائج الـ PCR-RFLP:

استهدفت الدراسة الحالية تسلسل جزء قصير من المورثة الميتوكوندرية 12S rRNA بسبب تباينه الكبير بين الأنواع اذ يسمح الرنا الريباسي بتحديد جميع اللحوم على مستوى النوع. وتم تضخيم المورثة باستخدام مرئسات عامة وكانت هذه المورثة فعالة بما يكفي لتضخيم وتحديد نوعي اللحوم التي تم تحليلها في هذه الدراسة.

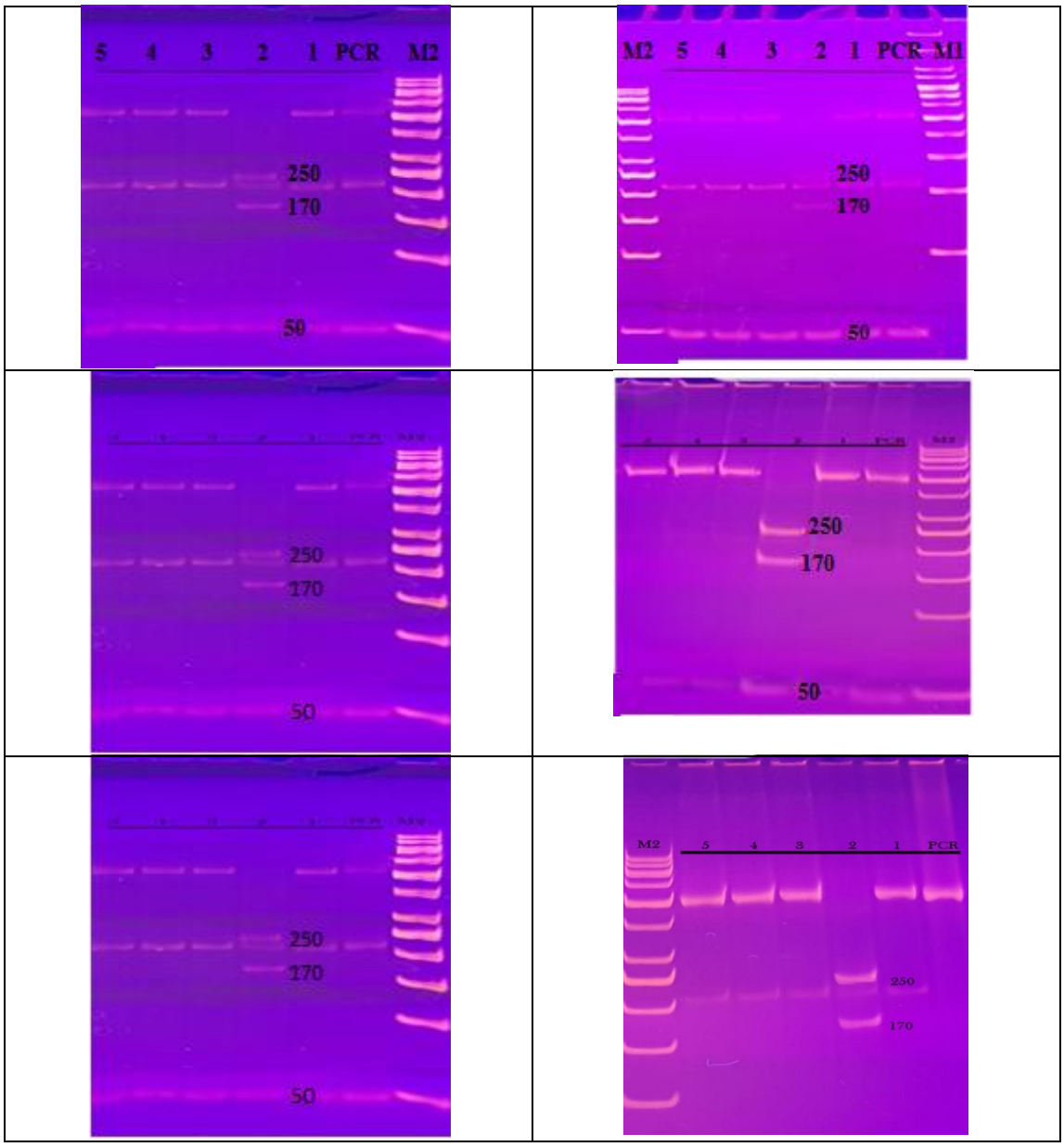
يتعرف كل إنزيم قطع (Restriction Enzyme) على تسلسل نيكلوتيدي معين في سلسلة الدنا الهدف ويعمل على قطع السلسلة عند هذا الموقع. يتم استثمار الاختلافات الجينية في سلسلة الدنا بين الأنواع المختلفة لإجراء القطع ومن ثم تحديد أطوال العصابات الناتجة عن القطع (نمط القطع) باستخدام الرحلان الكهربائي بحيث يكون نمط القطع مميز للنوع الواحد (Partis et al, 2000, 369). كانت نتائج قطع ناتج تضخيم الدنا بإنزيم القطع متطابقة لجميع المكررات العائدة لنفس العينة. لم تحدث انزيمات القطع المحددة ApoI، HhaI، MspI القطع لمنتج تضخيم المورثة للعينات المرجعية (شاهد إيجابي) ولكن عمل الإنزيم AluI على هضم (قطع) ناتج تضخيم المورثة ليعطي ثلاث عصابات بأطوال تقريبية 50bp و170bp و250bp في نوع الدجاج (G.gallus) وعصابتان بأطوال تقريبية 240bp و250bp في كل من نوع الديك الرومي البري (M.gallopavo) ونوع الديك الرومي ذو العيينات (M.ocellata). لم يهضم الإنزيم BspTI ناتج التضخيم في كل من نوع الدجاج (G.gallus) ونوع الديك الرومي ذو العيينات (M.ocellata)، لكنه أعطى عصابتان بأطوال تقريبية 70bp و420bp في نوع الديك الرومي البري (M.gallopavo) (الشكل 1).

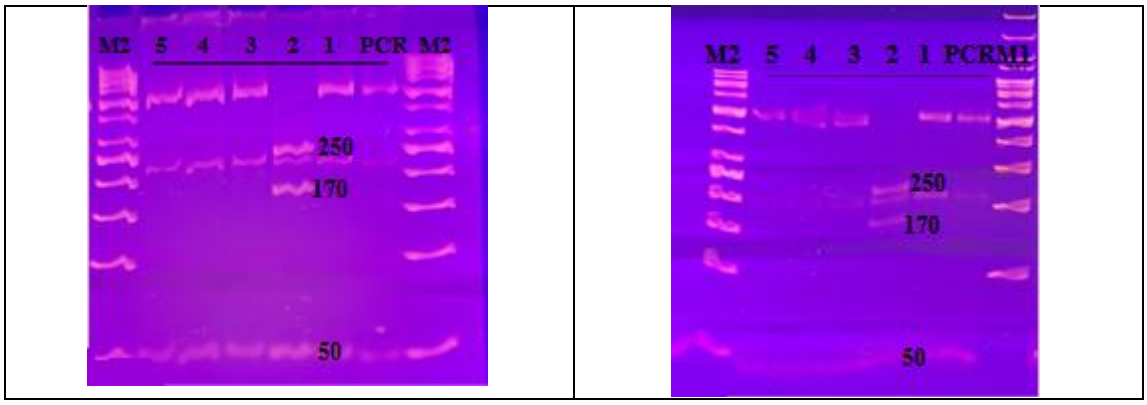


الشكل (1) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات الدم المرجعية في هلامة عديد الأكريلاميد.

تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

عمل الإنزيم AluI على هضم (قطع) ناتج تضخيم المورثة لكل العينات المدروسة ليعطي ثلاث عصابات بأطوال تقريبية 50bp و170bp و250bp ولم تهضم الإنزيمات ApoI، HhaI، MspI، BspTI ناتج التضخيم في كل العينات المدروسة. ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI وإنزيم القطع BspTI للعينات المرجعية مع طرز القطع الناتجة عن العينات المدروسة للعينات A، B، C، D، E، F، G، H نستنتج أن جميع العينات المدروسة مكونة من لحم الدجاج فقط (الشكل 2).





الشكل (2) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة للعينات المدروسة في هلامة عديد الأكريلاميد.

تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

إن النتائج المستحصلة من هذه الدراسة تشبه كثيراً نتائج الدراسات السابقة، إذ أشارت العديد من الدراسات في جميع أنحاء العالم عن وجود تسميات خاطئة لمحتوى الأنواع الحيوانية في اللحوم ومنتجاتها حيث بينت دراسة قامت بها الباحثة أماندا وزملاؤها أن ثلث منتجات لحم الديك الرومي في كندا قد تم استبدالها بالكامل بلحم الدجاج لدوافع اقتصادية (Naaum et al, 2018, 339). كما أظهرت دراسة أخرى أن جميع منتجات لحم الدجاج كانت إيجابية للحم الدجاج فقط أي أنه لا يوجد غش في منتجات لحم الدجاج ولم يتم العثور على لحم الخنزير ولحوم الحيوانات الأخرى الغير مسموحة دينياً ويعود السبب في الغالب لكون لحوم البقر والجاموس وغيرها من أنواع اللحوم أعلى من أسعار لحوم الدجاج (Uddin et al, 2021, 103938).

إن أحد أنواع الغش في اللحوم الأكثر انتشاراً يتضمن الاستبدال الكلي أو الجزئي للحم البقر بلحم الجاموس أو الاستبدال الجزئي للحم البقر بلحم الدجاج المنزوع العظم ميكانيكاً وكذلك استبدال الديك الرومي بالدجاج (Abuzinadah et al, 2015, 337)؛ (Kyvan et al, 2017, 261).

الجدول (3) طرز القطع الناتجة عن قطع إنزيمات القطع المحددة للدنا المضخمة للمورثة mt 12S rDNA لعينات الدم المرجعية ولعينات اللحوم المدروسة.

العينة	ناتج تضخيم المورثة (الطول تقريبي)	أنزيمات القطع المحددة		التطابق مع معلومات البائع
		AluI	BspTI	
دم دجاج G.gallus	490	50+175+250	-	عينة مرجعية
دم ديك رومي M.gallopavo	490	240+250	70+420	عينة مرجعية
دم ديك رومي M.ocellata	490	240+250	-	عينة مرجعية
A	490	60+175+250	-	مطابق
B	490	60+175+250	-	مطابق

C	490	60+175+250	-	مطابق
D	490	60+175+250	-	مطابق
E	490	60+175+250	-	غير مطابق
F	490	60+175+250	–	غير مطابق
G	490	60+175+250	-	غير مطابق
H	490	60+175+250	-	غير مطابق

إن هذه التقنية متعددة الاستعمالات، فيمكنها كشف مصادر أنواع الكائنات في العديد من المواد الحيوية المحتوية على الدنا إذ بينت دراسات عديدة أن طريقة الـ PCR-RFLP يمكن استخدامها من الآن فصاعداً كبديل موثوق لدراسة تسلسل الحمض النووي لتحديد أنواع اللحوم (Girish et al, 2005, 107)؛ (Girish et al, 2004, 551)؛ (Mahajan et al, 2011, 23)؛ (Galal-Khallaf, 2021, 145062). كما أنها بسيطة وسهلة التنفيذ وأقل استهلاكاً للوقت وتحتاج كمية منخفضة من الحمض النووي وأرخص بكثير من تسلسل الحمض النووي بالإضافة الى ذلك فهي لا تتطلب معدات متطورة أو مهارات تقنية عالية (Girish et al, 2005, 107)؛ (Sivaraman et al, 2018, 58)؛ (Uddin et al, 2021, 103938).

إن اعتماد هذه التقنية على تضخيم مورثة ميتوكوندرية موجودة بآلاف النسخ في الخلية الواحدة يزيد من حساسية هذه الطريقة (Girish et al, 2005, 107)؛ (Rashid et al, 2015, 1013)؛ (Uddin et al, 2021, 103938)؛ (Galal-Khallaf, 2021, 145062).

4-الاستنتاجات Conclusions:

إن جميع العينات المدروسة تعود لنوع الدجاج حيث يتم تسويق لحم الديك البلدي على كونه لحم حبش كنوع من الغش بدوافع اقتصادية لتحقيق المزيد من الأرباح. تعد تقنية PCR-RLFP رخيصة نسبياً ودقيقة وذات تكرارية ممتازة وهي حساسة وسريعة مما يؤهلها كتقنية هامة وعملية لتحديد هوية ومنشأ أنواع اللحوم المصنعة واستثمارها في الاختبارات الروتينية.

إن هذه الدراسة تعد من الدراسات التي تعنى بتحديد هوية أنواع اللحوم وتمييزها للكشف اللاحق عن الغش في اللحوم ومنتجاتها في سوريا.

التمويل Funding:

هذا البحث ممول من قبل جامعة دمشق وفق رقم التمويل: (501100020595) والهيئة العامة للتقانة الحيوية.

المراجع References:

1. Abuzinadah, O. H., Yacoub, H. A., El Ashmaoui, H. M., & Ramadan, H. A. (2015). Molecular detection of adulteration in chicken products based on mitochondrial 12S rRNA gene. Mitochondrial DNA, 26(3), 337-340.
2. Aida, A. A., Man, Y. C., 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(1), 47-52.
3. Alshaikh, B., Sumainah, G., & Rahmo, A. (2015). Meat Species Identification using Molecular Methods. Advances in Environmental Biology, 5, 709-715.
4. Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. Meat science, 86(3), 577-587.
5. Borgo, R., Souty-Grosset, C., Bouchon, D., & Gomot, L. (1996). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. Journal of Food Science,61(1),1-4.
6. Bottero, M. T., & Dalmasso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. The Veterinary Journal, 190(1), 34-38.
7. Branciari, R., Avellini, P., Sukasi-Sangamayya, R., & Di Antonio, E. (2000). PCR-RFLP analysis (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Lenght Polymorphysm) for species determination in heat-treated meat products. Industrie Alimentari (Italy), 39(390).
8. Cahyadi, M., Wibowo, T., Pramono, A., & Abdurrahman, Z. H. (2020). A novel multiplex-PCR assay to detect three non-halal meats contained in meatball using mitochondrial 12S rRNA gene. Food Science of Animal Resources, 40(4), 628.
9. Chung, E. R., Kim, W. T., Kim, Y. S., & Han, S. K. (2000). Identification of Hanwoo meat using PCR-RFLP marker of MC1R gene associated with bovine coat color. Korean Journal of Animal Science, 42(4), 379-390.
10. Colombo, F., Marchisio, E., Pizzini, A., & Cantoni, C. (2002). Identification of the goose species (Anser anser) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. Meat Science, 61(3), 291-294.
11. Drummond, M. G., Brasil, B. S. A. F., Dalsecco, L. S., Brasil, R. S. A. F., Teixeira, L. V., & Oliveira, D. A. A. (2013). A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. Food Control, 29(1), 131-137.
12. Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. Trends in Food Science & Technology, 21(8), 408-421.
13. Galal-Khallaf, A. (2021). Multiplex PCR and 12S rRNA gene sequencing for detection of meat adulteration: A case study in the Egyptian markets. Gene, 764, 145062.
14. Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, K. N. Viswas, B. M. Shivakumar, M. Anand, M. Patel and S. Bhaskar. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisim (PCR-RFLP) of mitochondrial 12SrRNA gene. Meat Science,. 70:107-112.
15. 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, 66:551-556.
16. He, H., Wang, Y., Qing, Y., Li, D., Zhao, X., Zhu, Q., & Yin, H. (2018). Molecular authentication of meats from three terrestrial birds based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12s rRNA gene. Brazilian Journal of Poultry Science, 20, 651-656.
17. Islam, A., Halder, J., Rahman, A. M., Ud-Daula, A., Uddin, S., Hossain, M. K., ... & Alam, J. (2021). Meat origin differentiation by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. International Journal of Food Properties, 24(1), 1022-1033.
18. Keyvan, E., İPLİKÇİOĞLU, G. Ç., ÇINAR, B. K., BİLGEN, N., & ŞİRELİ, U. T. (2017). Identification of meat species in different types of meat products by PCR. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 64(4), 261-266.
19. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(16), 6196-6200.

20. Kumar, A., Kumar, R. R., Sharma, B. D., Gokulakrishnan, P., Mendiratta, S. K., & Sharma, D. (2015). Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review. Critical reviews in food science and nutrition, 55(10), 1340-1351.
21. Lakzadeh, L., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., & Fazeli, M. (2013). Application of PCR and SYBR green q rti-PCR assays for the identification and quantification of chicken meat under different cooking conditions. Food Biotechnology, 27(3), 249-260.
22. Li, Y. C., Liu, S. Y., Meng, F. B., Liu, D. Y., Zhang, Y., Wang, W., & Zhang, J. M. (2020). Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration. Comprehensive Reviews in Food science and Food safety, 19(4), 2256-2296.
23. Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. Trends in Food Science & Technology, 11(2), 67-77.
24. Mahajan. V, M., Y. P, G., V. D, D., R. D, K., & A. S, B. (2011). Molecular detection of meat animal species targeting MT 12S rRNA gene. Meat Science, 88(1), 23-27.
25. Maiorano, G., Knaga, S., Witkowski, A., Cianciullo, D., & Bednarczyk, M. (2011). Cholesterol content and intramuscular collagen properties of pectoralis superficialis muscle of quail from different genetic groups. Poultry Science, 90(7), 1620-1626.
26. Mandli, J., El Fatimi, I., Seddaoui, N., & Amine, A. (2018). Enzyme immunoassay (ELISA/immunosensor) for a sensitive detection of pork adulteration in meat. Food Chemistry, 255, 380–389.
27. Mane, B. G., Mendiratta, S. K., & Tiwari, A. K. (2012). Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. Food Control, 28(2), 246-249.
28. Matsunga, T., K. Chikuni, R. Tanabe, H. Muroya, K. Shibata, J. Yamada and Y. Shinmura, (1998). Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (cervus alphus) and the differentiation of closely related deer meats. Meat Science, 49 :379-385.
29. Naaum, A., Shehata, H., Chen, S., Li, J., Tabujara, N., Awmack, D., … Hanner, R. (2018). Complementary molecular methods detect undeclared species in sausage products at retail markets in Canada. Food Control, 84, 339–344.
30. Parakash, P. S., M. S. Ghumatkar, S. V. Nandode, S. K. Yogesh and S. Shouche. (2000). Mitochondrial 12S rRNA sequence analysis in wild life forensics. Current Science. 78 :1542-1551.
31. Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., & Murby, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. Meat Science, 54(4), 369-376.
32. Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G. (2019). The quality of DNA isolated from processed food and feed via different extraction procedures. Molecules, 24(6), 1188.
33. Rashid, N. R. A., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Razzak, M. A., Asing, & Amin, M. A. (2015). A suitable method for the detection of a potential fraud of bringing macaque monkey meat into the food chain. Food Additives & Contaminants: Part A, 32(7), 1013-1022.
34. Saez, R., Sanz, Y., & Toldrá, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. Meat Science, 66(3), 659-665.
35. Şakalar, E., Abasiyanik, M. F., Bektik, E., & Tayyrov, A. (2012). Effect of heat processing on DNA quantification of meat species. Journal of food science, 77(9), N40-N44.
36. Sentandreu, M. Á., & Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud. Food Research International, 60, 19-29.
37. Shen, X. J., Ito, S. I., Mizutani, M., & Yamamoto, Y. (2002). Phylogenetic analysis in chicken breeds inferred from complete cytochrome b gene information. Biochemical Genetics, 40, 129-141.
38. Sivaraman, B., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Alamelu, V., Wilwet, L., Aanand, S., & Sukumar, D. (2018). PCR-RFLP for authentication of different species of processed snappers using mitochondrial D-loop region by single enzyme. Food Control, 90, 58-65
39. Sreenivasan Tantuan, S., & Viljoen, C. D. (2021). Determining the presence of undeclared animal species using Real-time PCR in canned and ready-to-eat meat products in South Africa. Journal of Food Science and Technology, 58, 2699-2704.
40. Uddin, S. M. K., Hossain, M. M., Chowdhury, Z. Z., & Johan, M. R. (2021). Detection and discrimination of seven highly consumed meat species simultaneously in food products using heptaplex PCR-RFLP assay. Journal of Food Composition and Analysis, 100, 103938.

41. Wang, Q., Zhang, X., Zhang, H. Y., Zhang, J., Chen, G. Q., Zhao, D. H., ... & Liao, W. J. (2010). Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. Meat Science, 85(2), 265-269.
42. Xu, R., Wei, S., Zhou, G., Ren, J., Liu, Z., Tang, S., … Wu, X. (2018). Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat products. Meat Science, 137, 41–46.