تحديد هوية أنواع اللحوم الداخلة في خلطات تصنيع أغلب أنواع اللانشون (المرتديلا) الموجودة في الاسواق السورية باستخدام تقنية PCR-RFLP

بنان الشيخ* **عبد الحكيم عزيزية**** **عصام قاسم*****

الملخص

هدف البحث الى تحديد هوية أنواع اللحوم الداخلة في خلطات تصنيع المرتديلا الموجودة في السوق المحلية، مصنعة محلياً ومستوردة، ودراسة مدى تطابق النتائج مع بطاقة البيان الخاصة بها من خلال تطبيق تقنية هضم الدنا المضخم بإنزيم القطع المحدد (PCR-RFLP). جمعت 11عينة مختلفة من المرتديلا عشوائياً في الشهر الخامس من العام 2018. تم اجراء البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق.

تبين نتيجة هذا البحث أن عينات المرتديلا المستوردة مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها من حيث نوع اللحوم بينما كانت ثلاث من العينات المحلية مطابقة لبطاقة البيان وأربعة منها غير مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها.

الكلمات المفتاحية: نوع اللحم، بطاقة البيان، مرتديلا، PCR-RFLP، إنزيمات القطع المحددة.

*باحث مساعد– قسم الحيويات الطبية والحيوانية – الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق.

**أستاذ في قسم علوم اللأغذية– كلية الزراعة – جامعة دمشق.

***أستاذ في قسم الحياة الحيوانية – كلية العلوم – جامعة دمشق.

Meat Species Identification in Commercially Processed Meats ingridients of Most Kinds of Lunchoen (Mortadella) in the Syrian Markets using the PCR-RFLP Techneque

B. Alshaikh[*] A. Azizieh[**] I. Kasem[***]

This research aimed to identify meat species source in commercially processed meats (mortadella) in the Syrian markets, imported and locally processed, and to evaluate the conformity with the actual ingredients and the stated food labels by applying PCR-RFLP technique. Eleven different samples of mortadella were randomly collected during the fifth month of 2018. The research was conducted in the National Commission for Biotechnology laboratories, Damascus, Syria.

The results show that all imported mortadella samples were identical to their respective food labels in terms of meat species sources, while just three of local samples were identical to the food labels and four of them were not identical to their respective food labels.

Key words: Meat Species, Food label, mortadella, PCR-RFLP, restriction enzymes.

[*] Research assistant- medical and animal biology department- National Commission for Biotechnology-Damascus.

[**] Professor in food science department- Faculty of Agriculture- Damascus University.

[***] Professor in zoology department- Faculty of sciences-Damascus University.

المقدمة:

تُعد اللحوم المصنعة من الاطعمة المرغوبة لدى شريحة واسعة من المستهلكين بسبب محتواها العالي من البروتينات الضرورية لنمو الجسم وطعمها المحبب وسهولة تداولها.

تسعى شركات صناعة الغذاء لتحقيق متطلبات المستهلك بمنتجات مرغوبة اذ تمتلك صناعة اللحوم حصة كبيرة على مستوى العالم في تزويد الغذاء. إن الطلب المتزايد على منتجات اللحوم المصنعة تجعلها في طليعة القضايا الهامة المتعلقة بجودة الغذاء (Aida وزملاؤه، 2005).

لايشكل غش اللحوم مشكلة اقتصادية فقط وإنما يؤدي الى مشاكل صحية خطيرة للمستهلكين وكذلك قد يؤدي الى تجاوزات دينية فيما يتعلق بالأكل الحلال (Brodman وMoor، 2003 ; Kesman وزملاؤه، 2007).أصبحت طرائق غش الأغذية بما فيها اللحوم أكثر تعقيدا وبالتالي هناك حاجة الى تقنيات كشف غش موثوقة و ذات كفاءة عالية.

تعد اللحوم من أكثر المواد الغذائية عرضة للغش والذي يكون إما باستبدال اللحوم ذات السعر المرتفع بلحوم أخرى رخيصة في حال اللحم النيء، أو خلطها بلحوم السواقط في حال اللحم المفروم، أو بإضافة بعض المواد النباتية الخام (فول الصويا وغيرها) إلى الخلطات المعدة لتصنيع اللحوم في حال منتجات اللحوم المصنعة (Girish وزملاؤه، 2004; Garcia وزملاؤه، 2006).

وبناء عليه هناك ضرورة لاعتماد طرائق تتميز بالنوعية والموثوقية والسرعة تكون قادرة على تحديد هوية اللحم في منتجات اللحوم المصنعة بما يضمن أن تكون بطاقة بيان منتجات اللحوم المعروضة للمستهلك دقيقة تماماً بالنسبة لنوع اللحم الذي تحتويه(Bai وزملاؤه، 2009). يتوفر عدد كبير من الطرائق التحليلية لتحليل اللحوم منها: الطرائق المعتمدة على الكروماتوغرافيا، الطرائق المعتمدة على البروتين كالطرائق المناعية والرحلان الكهربائي،

وهذه الطرائق غير حساسة بالنسبة للمواد المصنعة وخصوصا لأنواع اللحوم المتقاربة، كما أنها مكلفة تحتاج إلى وقت طويل (Bai وزملاؤه، 2009).

تعد الطرائق المعتمدة على تحليل الدنا DNA أكثر ملائمة في تحليل الأغذية بسبب الثباتية العالية للدنا و تواجده في معظم الأنسجة البيولوجية وهي ذات أهمية كبيرة في تحديد هوية الأنواع كما أنها تعتبر طريقة بسيطة، سريعة، حساسة ونوعية ومن اهمها: طريقة التفاعل السلسلي للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR) (Gouli وزملاؤه، 1999) هضم الدنا المضخم بإنزيم القطع المحدد Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Bartlett و Davidson، 1992; Brodmann وMoor، 2003). تضخيم الدنا المتعدد الأشكال العشوائي Random Amplification of DNA Polymorphic DNA(RAPD-PCR) (Koh وزملاؤه، 1998) سَلسَلة الدنا DNA Sequencing (Colombo وزملاؤه، 2002). تهجين الدنا DNA hybridization (Chikuni وزملاؤه، 1990).

تُضخم في طريقة هضم الدنا المضخم بإنزيم القطع المحدد Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) منطقة محددة ومصانة من سلسلة الدنا باستخدام الـ PCR ثم يتبع ذلك هضم بإنزيمات القطع والتي توضح الاختلافات الوراثية بين الأنواع (Partis وزملاؤه، 2000).

وكلاً من المورثات النووية والميتوكوندرية يمكن استخدامهما لكشف أنواع اللحوم باستخدام طريقة PCR-RFLP. ومن بين المورثات الميتوكوندرية الأكثر استخداماً لتمييز أنواع اللحوم: المورثة سيتوكروم b (Branciari وزملاؤه، 2000) والمورثة الميتوكوندرية 12S rDNA (Girish وزملاؤه، 2005 Alshaikh ; وزملاؤها، 2015) والمورثة الميتوكوندرية 16S rDNA (Borgo وزملاؤه، 1996).

في دراسة سابقة تمت على نفس المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA وباستخدام نفس تقنية الـ PCR-RFLP حيث تم عزل الدنا من نسيج اللحم او الدم لـ 14 نوع حيواني (غنم، ماعز، بقر، جمل، جاموس، خنزير، حصان، حمار، أرنب، كلب، قطة، جرذ، فأر، دجاج) ومن ثم تضخيم المورثة الهدف باستخدام تقنية الـ PCR ثم بعد ذلك تم هضم منتج التضخيم باستخدام خمس إنزيمات تقطيع ApoI, AluI, HhaI, MspI, BspTI حيث تم تمييز كل الانواع المدروسة عن بعضها عن طريق مقارنة طرز القطع الناتجة في كل نوع. فمثلا كانت طرز القطع باستخدام الإنزيمات الخمسة في نوع الغنم كما يلي bp365+bp130 للإنزيم ApoI/ 250bp+bp200 للإنزيم AluI/ bp480 للإنزيم HhaI / bp400+ bp90 للإنزيم MspI/ bp480 للإنزيم BspTI وفي نوع البقر كانت طرز القطع على الترتيب كالتالي bp480 / bp400+ bp95 /bp480 / bp480/bp480 وفي نوع الجاموس كانت طرز القطع bp480 / bp480 / bp250+ bp225 / bp420+bp90 / bp480 وفي نوع الدجاج كانت طرز القطع bp480 / bp250+bp170+bp50/ bp480 /bp480/ bp480 على التوالي (Alshaikh وزملاؤها، 21015).

أهداف البحث:

هدف هذا البحث الى تحديد هوية اللحوم الداخلة في خلطات تصنيع المرتديلا للعينات المأخوذة عشوائيا من السوق السورية لعام 2018 من خلال تطبيق طريقة PCR-RFLP على المورثة المسؤولة عن تعبير mt12S rRNA ومعرفة مدى مطابقة مكونات محتوى علبة المرتديلا مع بطاقة البيان الخاصة بكل عينة.

مواد البحث وطرائقه:

1-جمع العينات:

جمعت 11 عينة وبثلاث مكررات (من محلات بيع مختلفة) من المرتديلا من السوق السورية المصنعة محليا والمستوردة على حد سواء خلال الشهر الخامس من العام 2018 وفق الجدول (1). وهي معلبات ضمن صفيح مستطيلة الشكل قياسها (5X5X9.5 سم).

الجدول (1): يبين عينات اللحوم المصنعة المدروسة:

العينة		مكونات بطاقة البيان	العدد
عينات المرتديلا المستوردة	A	80% لحم دجاج	3
	B	80% لحم دجاج	3
	C	80% لحم (بقر ودجاج)	3
	D	70% بقر 10 % دواجن	3
عينات المرتديلا المصنعة محلياً	E	لحم دجاج	3
	F	لحم بقر و دجاج	3
	G	لحم بقر و دجاج	3
	H	لحم دجاج	3
	I	لحم دجاج	3
	J	لحم بقري ولحم دجاج	3
	K	لحم دجاج	3

2- تحضير العينات:

تم أخذ عينة بوزن 25غ تقريبا، من مركز العبوة وباستخدام مشرط عقيم. تم وضع كل عينة في جفنة سيراميك معقمة، في فرن بدرجة حرارة 155 م لمدة ثلاث ساعات، لضمان عدم التلوث الاعتراضي بالدنا. سحقت العينات بعد غمرها بالآزوت السائل بشكل تام لمدة وجيزة

حتى أصبحت بودرة ناعمة، وأخذت منها عينة بوزن 50 ملغ في كل مرة (Alshaikh وزملاؤها، 2015).

3- استخلاص الدنا:

تم عزل الدنا الكلي من كل عينة باستخدام طاقم عزل مناسب (QIAamp Blood MiniKit) من شركة كياجين (Qiagen, Germany)، واتبعت الإجراءات الخاصة بعزل الأنسجة والموصى بها من الشركة الصانعة مع اجراء بعض التعديلات: زيادة تركيز بروتيناز K حتى يصل الى 6 ميكروغرام/ميكروليتر، تمديد فترة الحضن بحيث أصبحت طوال الليل، ومضاعفة كمية المحلول الواقي AL (AL Buffer) المضافة(Alshaikh وزملاؤها، 21015) تم قياس كمية الدنا في طول الموجة 260 نانومتر واستخدمت نسبة الامتصاص 260/280 لتعيين جودة الدنا (~1.7<).

4- 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`

كما هو موضح من قبل Kocher وزملاؤه،1989 وإجراء التضخيم في أنابيب PCR 0.2 مل، حيث احتوى كل أنبوب الاضافات التالية: 12.5 µl ماستر ميكس (GeneDirex, Malaysia)، 3 µl من كل مرئسة بتركيز 8 µM، 5-15 µl دنا معزولة بكمية 500 نانوغرام (Alshaikh وزملاؤها، 2015) في حجم التفاعل 50 µl بإضافة ماء خاص بالبيولوجيا الجزيئية خال من الإنزيمات الهاضمة للدنا والرنا (Roth, Germany). استخدم المدور الحراري من الطراز Mastercycler (Eppendorf, Germany) وفق شروط الدورات الحرارية التالية: 5 دقيقة بدرجة حرارة 94° م للمسخ الأولي initial denaturation

، ثم أتبعت بـ 36 دورة تضخيم: 45 ثانية بدرجة حرارة 94°م، 45 ثانية بدرجة حرارة 60°م، 1 دقيقة بدرجة حرارة 72 م. وأخيراً 10 دقيقة بدرجة حرارة 72°م للاستطالة النهائية final extension (Girish وزملاؤه، 2004). تم ترحيل منتجات التضخيم على هلامة آغاروز 2% وصبغت ببرومايد الايثيديوم.

5- الهضم بإنزيمات القطع المحددة Restriction Analysis:

تم اعتماد إنزيمات قطع محددة وهي ApoI, AluI, HhaI, BspTI, MspI (Girish وزملاؤه، 2005; Alshaikh وزملاؤها، 2015) ويتيح حدوث القطع بإنزيم محدد وأطوال العصابات الناتجة تحديد هوية كل من هذه اللحوم المذكورة علماً أنه تم استخدام كل من سلمي الدنا المئوي الأساس 100bp DNA Ladder (M1) (Biolab, England) والخمسيني الأساس 50bp DNA Ladder (M2) (Fermentase, Canada) لتحديد طول العصابات الناتجة بشكل تقريبي.

تمت معاملة منتجات التضخيم الناتجة بإنزيمات القطع المحددة الواردة في الجدول رقم (2) (Fermentase, Canada) وباستخدام محاليل واقية مناسبة وفق تعليمات الشركة المصنعة مع اجراء بعض التعديل (Alshaikh وزملاؤها، 2015) وذلك ضمن أنابيب 0.2 مل عقيمة، حضنت في درجة الحرارة 37 م طوال الليل، ثم تم ترحيل منتجات الهضم في هلامة عديد اكريل الأميد 8% (1:29).

الجدول (2): إنزيمات القطع المحددة المستخدمة.

رقم الإنزيم	اسم الإنزيم	مكان القطع	المحلول الواقي الموصى به لفعالية 100%	درجة الحرارة المناسبة
1	ApoI (XapI)	R⇩AATTY	Tango 1X	37 °م
2	AluI	AG⇩CT	Tango 1X	37 °م
3	HhaI	GCG⇩C	Tango 1X	37 °م
4	MspI (HpaII)	C⇩CGG	Tango 1X	37 °م
5	BspTI (AfIII)	C⇩TTAAG	Orange 1X	37 °م

- **تمثل R الأساس G** أو **A**
- **تمثل Y الأساس C** أو **T**

بعد ذلك تم مقارنة نتائج رحلان منتجات الهضم لعينات اللحوم المصنعة مع طرز القطع الناجمة عن إنزيمات القطع المحددة للدنا المضخمة للمورثة mt 12S rDNA لأنواع اللحوم المرجعية المدروسة سابقاً لمعرفة نوع اللحوم الداخلة في خلطة تصنيع منتجات اللحوم المدروسة في هذا البحث.

النتـائـــج والمناقشـــــة:

1- استخلاص الدنا:

تم أخذ العينات من مركز عبوة المرتديلا لضمان الحصول على عصابات واضحة وذات كثافة عالية مقارنة بالعصابات الناتجة عن العينات المأخوذة من المواقع السطحية من العبوة بسبب تعرض المواقع السطحية لظروف حرارية أقسى من المواقع المركزية نتيجة لعمليات التعقيم التي تتم خلال مراحل تصنيع المرتديلا (116–118°م لمدة 60 دقيقة، 1.2 ضغط جوي) مما يؤدي إلى تكسر الدنا بشكل كبير، حيث نلاحظ وجود مشح على طول البئر عند الترحيل على هلامة الآغاروز 1% كما يظهر في العينات (A,B,C,D,H,I,K) وهذا يتفق مع الدراسة المقدمة من قبل (Alshaikh وزملاؤها، 2015; Matsunage وزملاؤه، 1998)

يسمح وجود الدنا الميتوكوندري بآلاف النسخ في الخلية بالحفاظ على جزء كاف من النسخ بحالة جيدة عند تعريض العينة لظروف تصنيع قاسية (Girish وزملاؤه، 2005) ومع ذلك فقد وجد نتيجة هذه الدراسة أن بعض العينات أعطت مشحاً ضعيفاً جداً على طول البئر وهذا ما ظهر في العينات (E,F,G,J) وقد يعزى ذلك الى وجود كميات قليلة جداً من اللحم داخلة بخلطات تصنيع المرتديلا بالإضافة الى المعاملات الميكانيكية القاسية وعمليات التعقيم التي تتم خلال مراحل تصنيع المرتديلا والتي تؤدي الى تكسر الدنا بشكل كبير (النتائج غير موضحة بالصور).

تراوحت كمية الدنا المستخلصة بالطريقة المتبعة في بروتوكول عزل الدنا المعتمد في هذه الدراسة ضمن المجال من 25 الى 56 ميكروغرام/مل وتراوحت نقاوتها بين 1.6 – 2.

2- تضخيم الدنا لجزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA:

تحوي سلسلة الدنا الميتوكوندري مناطق مصانة في العديد من الحيوانات (Antoinette وزملاؤها، 1995). ولذلك تم استخدام المرئستين العامتين للمورثة mt 12S rDNA لترتبطا بمنطقتين مصانتين وتضخما المنطقة الفاصلة والمتنوعة من تلك المورثة لدى الأنواع المتعددة من الحيوانات (Kocher وزملاؤه، 1989; Parakash وزملاؤه، 2000).

يضخم زوج المرئسات المستخدمة في هذه الدراسة جزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA في جميع أنواع لحوم الثديات لتعطي العصابة ذات الطول التقريبي 480bp، المقاربة لما نشر في المرجع (Girish وزملاؤه، 2004). وفي نوع الدجاج كان طول العصابة التقريبي 500bp (Alshaikh وزملاؤها، 2015).

لم تتأثر العصابات الناتجة عن التضخيم بالمكونات الأخرى الداخلة في تصنيع المرتديلا كالبروتينات النباتية المضافة (بروتين فول الصويا) وغيرها من الاضافات الاخرى الداخلة في خلطات تصنيع المرتديلا.

أعطت بعض عينات المرتديلا المدروسة عصابتين يمكن تمييزهما بسهولة وهما، ~ 480bp و~500bp عند الترحيل على هلامة متعدد الأكريل أميد وهذا يتوافق مع (Alshaikh وزملاؤها، 2015) كما يظهر في العينات (C, D) وهذا يدل على وجود خليط من اللحوم. بينما أعطت بعض العينات عصابة واحدة فقط بطول ~500bp عند الترحيل على هلامة الأكريل أميد (Alshaikh وزملاؤها، 2015) كما يظهر في العينات (A, B, H, I, K) مما يدل على وجود نوع واحد من اللحوم. لم تعط بعض العينات عصابة واضحة وقد يعزى ذلك الى عدم نجاح عملية تضخيم المورثة الهدف نتيجة لتكسر الدنا بشكل كبير جداً بالإضافة الى قلة كمية اللحم الداخلة في خلطات تصنيع المرتديلا كما في العينات (E,F,G,J) وهذا ما يظهر في البئر PCR في الاشكال (1، 2) وهذا يتوافق مع نتائج (Alshaikh وزملاؤها، 2015).

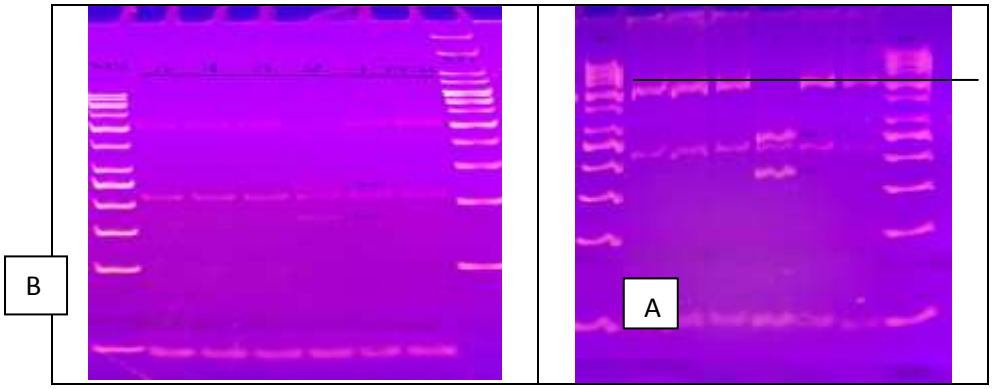
3- هضم الدنا المضخمة لجزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA:

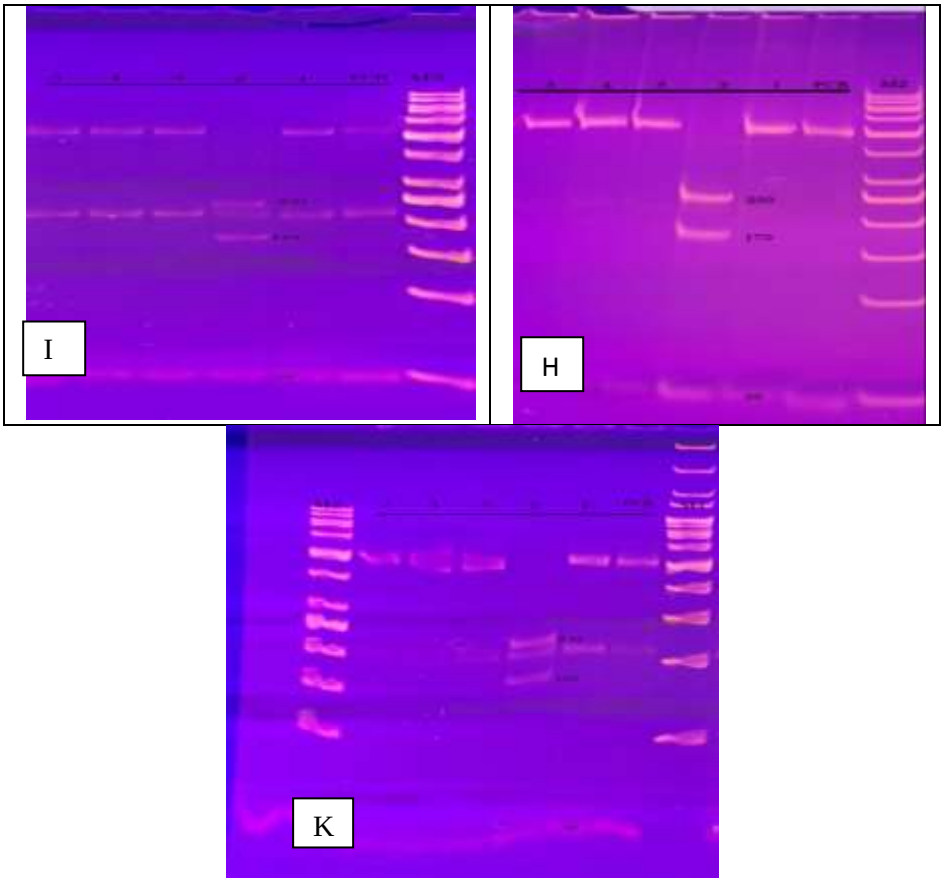
يتعرف إنزيم التقطيع على تسلسل أسس معين خاص بكل إنزيم تقطيع على طول سلسلة الدنا الهدف ثم يعمل على قطع (هضم) السلسلة عند هذا الموقع. وبالتالي بإمكان إنزيمات التقطيع أن تظهر الاختلافات الجينية بين الأنواع إذ يتم استثمار الاختلافات (التباينات) في سلسلة الدنا لإجراء القطع ومن ثم رؤية نمط العصابات الناتجة باستخدام الرحلان الكهربائي بحيث يكون نمط القطع مميز للنوع الواحد (Partis وزملاؤه، 2000).

كانت نتائج هضم الدنا المضخم بإنزيمات القطع المحددة متطابقة مع جميع المكررات العائدة لنفس العينة.

عند معاملة منتج التضخيم بإنزيمات التقطيع المختلفة ApoI, AluI, HhaI, MspI, BspTI في العينات A و B و H و I و K والتي أعطت عصابة ذات الطول التقريبي ~500bp حيث لوحظ عدم حدوث هضم للعصابة بإنزيمات القطع ApoI, HhaI, MspI, BspTI وهذا يعني عدم تعرف الإنزيمات على الموقع الخاص بها على طول السلسة المضخمة

وبالتالي بقاء العصابة على حالها (طول العصابة bp500). بينما عمل الإنزيم AluI على هضم العصابة ليعطي ثلاث عصابات بالأطوال التقريبية 50bp و 170bp و 250bp ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن هضم منتج التضخيم بنفس الإنزيمات على التوالي مع طرز القطع الناتجة عن هضم منتج التضخيم لدنا نوع الدجاج نستنتج أن المكون الرئيسي لعينات المرتديلا A و B و H و I و K هو لحم الدجاج وهذا يتوافق مع (Alshaikh وزملاؤها، 2015) (الشكل 1) ولدى مقارنة محتوى عينات المرتديلا A و B و H و I و K من اللحم مع ما هو مذكور في محتويات بطاقة البيان والتي تشير الى وجود مكوّن واحد من اللحم وهو لحم الدجاج (80% لحم دجاج) نستنتج وجود تطابق مكونات خلطة تصنيع المرتديلا مع بطاقة البيان.

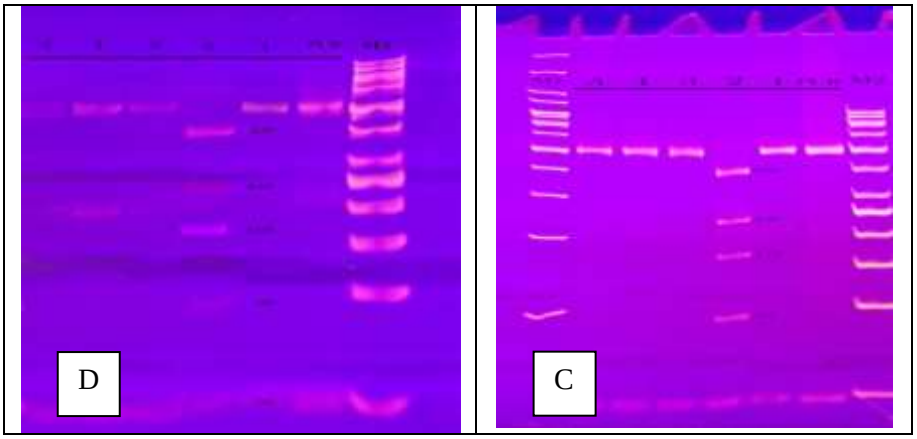




الشكل (1): رحلان كل من منتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA ومنتجات هضم الدنا المضخمة للعينات A و B و H و I و K في هلامة عديد الأكريل أميد. تمثل جميع آبار الهلامات المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، المشهد PCR: منتج التضخيم، 1: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

عند معاملة منتجات التضخيم بإنزيمات القطع المختلفة ApoI, AluI, HhaI, MspI, BspTI في العينات C و D والتي أعطت عصابتان، عصابة بطول تقريبي ~500bp وعصابة بطول تقريبي ~480bp لوحظ عدم حدوث هضم للعصابة بإنزيمات القطع ApoI, HhaI, MspI, BspTI. بينما عمل الإنزيم AluI على هضم العصابتان ليعطي خمس عصابات بالأطوال التقريبية 50bp و90bp و 170bp و 250bp و400bp ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن هضم منتجات التضخيم بنفس الإنزيمات على التوالي مع طرز القطع الناتجة عن هضم منتج التضخيم لدنا نوع الدجاج ودنا نوع لحم البقر نستنتج أن مكون عينتي المرتديلا C و D هو لحم الدجاج ولحم البقر وهذا يتوافق مع (Alshaikh وزملاؤها، 2015).

(الشكل 2) ولدى مقارنة محتوى عينتي المرتديلا C و D من اللحم مع ما هو مذكور في محتويات بطاقة البيان والتي تشير الى وجود خليط من اللحم (بقر ودجاج) نستنتج وجود تطابق مكونات خلطة تصنيع المرتديلا مع بطاقة البيان.



الشكل (2): رحلان كل من منتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA ومنتجات هضم الدنا المضخمة للعينات C و D في هلامة عديد الأكريل أميد. تمثل جميع آبار الهلامات المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، المشهد PCR: منتج التضخيم، 1: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة منتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

لم تعط العينات (E,F,G,J) منتج تضخيم (عصابة واضحة) عند الترحيل على هلامة متعدد الاكريل أميد وبالتالي لم يتم معاملة منتج التضخيم بإنزيمات التقطيع الخمسة. إن عدم ظهور عصابة واضحة حتى عند زيادة كمية الدنا الداخلة في تفاعل الـ PCR وزيادة عدد الدورات الحرارية الى 40 دورة حرارية يعني عدم التزام الشركة المصنعة بنسب ادخال اللحوم في خلطات تصنيع المرتديلا كما تنص عليه المواصفة القياسية السورية الخاصة باللحوم المصنعة بحيث تكون نسب الخلط أقل من الحدود الدنيا للكشف وبالنتيجة عدم تطابق مكونات خلطة تصنيع المرتديلا في العينات (E,F,G,J) مع مكونات بطاقة البيان.

الجدول (3): يوضح طرز القطع الناجمة عن هضم إنزيمات القطع المحددة للدنا المضخمة للمورثة mt 12S rDNA لأنواع المرتديلا.

العينة	PCR	إنزيم القطع المحدد					بطاقة البيان
		ApoI	AluI	HhaI	MspI	BspTI	
Aمستورد	500	–	50+170+250	-	-	-	مطابق
Bمستورد	500	-	50+170+250	-	-	-	مطابق
Cمستورد	500+480	-	50+170+250+90+400	-	-	-	مطابق
Dمستورد	500+480	-	50+170+250+90+400	-	-	-	مطابق
E مستورد	X	-	-	-	-	-	مطابق
Fمحلي	X	-	-	-	-	-	غير مطابق
Gمحلي	X	-	-	-	-	-	غير مطابق
Hمحلي	500	-	50+170+250	-	-	-	غير مطابق
Iمحلي	500	-	50+170+250	-	-	-	مطابق
Jمحلي	X	-	-	-	-	-	مطابق
Kمحلي	500	-	50+170+250	-	-	-	غير مطابق

إن هذه التقنية متعددة الاستعمالات، فيمكنها كشف مصادر أنواع الكائنات في العديد من المواد الحيوية المحتوية على الدنا (Girish وزملاؤه، 2004). كما أن اعتماد هذه التقنية على تضخيم مورثة ميتوكوندرية موجودة بآلاف النسخ في الخلية الواحدة يزيد من حساسية هذه الطريقة (Girish وزملاؤه، 2005). وبالتالي يمكن القول بأن العائق الرئيسي لهذه الطريقة يتمثل في عجزها عن كشف الغش في خلائط اللحوم، إذ لا يمكن تحديد نسب خلط أنواع اللحوم في الخلطة المعدة لتصنيع المرتديلا المدروسة وذلك لعدة أسباب أهمها: إن العينة وإن كانت نسب خلط أنواع اللحوم فيها معروفة فإن كمية الدنا الناجمة عن الاستخلاص، في أغلب الأحيان، قد لا تمثل الخليط، كما أن التضخيم الحاصل لدنا الأنواع المختلفة لايعكس بالضرورة نسبة الخلط قبل عملية التضخيم، وهذا يؤدي إلى نتائج لاتمثل نسبة الخلط الدقيقة للحوم (Girish وزملاؤه، 2005).

الاستنتاجات:

إن العينات (A, B, C, D, H, I, K) كانت مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها، بينما العينات (E, F, G, J) لم تكن مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها وذلك ضمن حدود الكشف التي تسمح بها هذه الطريقة في العينات المعرضة لظروف تصنيع ميكانيكية و حرارية قاسية جداً. إن طريقة PCR-RLFP تعد طريقة رخيصة نسبيا ودقيقة وذات تكرارية ممتازة وهي حساسة وسريعة مما يؤهلها كطريقة هامة وعملية لتحديد هوية ومنشأ أنواع اللحوم المصنعة.

التوصيات:

سيتم في دراسة لاحقة تحديد نسب الخلط المئوية للبروتينات النباتية والحيوانية الداخلة في الخلطات المعدة للتصنيع وبالتالي اضافة مصداقية اكبر لبطاقة البيان الخاصة بالمنتج وتلافي قصور المواصفات السورية الخاصة بمصنعات اللحوم.

المراجع References:

1. Aida, A. A., Y. B. Che Man, C. M. Wong, A. R. Raha and R. Son, 2005. **Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication**. *Meat Science*. 69: 47-52.
2. Alshaikh, B., Sumainah, G. and Rahmo, A., 2015. **Meat Species Identification using Molecular Methods**. Advances in Environmental Biology. 5: 709-715.
3. Antoinette, C. L. Van der kuyl Carla, J.T. Kuike and G.J. Dekker, 1995. **Phyologeny of African monkeys based upon mitochondrial 12S r RNA sequences. Journal of Molecular Evolution.** *Journal of Molecular Evolution.* 40: 173-180.
4. Bartlett, S.E. and W.S. Davidson, 1992. **FINS (forensically informative nucleotide sequences) a procedure for identifying the animal origin of biological specimens.** *Biotechniques.* 12: 408-411.
5. Bai, W., X. Wentao, H. Kunlun, Y. Yanfang, C. Sishuo and L. Yunbo, 2009. **A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species.** *Food Control.* 20: 366-370.
6. Borgo, R., C. Souty Grosset, Bouchon and D. L. Gomot, 1996. **PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA of quail meat species.** *Journal of Food Science.* 61: 1-4.
7. Branciari, R., P. Avellini, S.R. Sukasi, E. Antonio and S. Rea, 2000. **PCR-RFLP analysis (polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism) for species determination in heat-treated meat products.** *Industrie-Alimentarie.* 39: 313-318.
8. Brodmann, P.D. and D. Moor, 2003. **Sensitive and semi-quantitive TaqMan real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (Bos Taurus) and the detection of the family Mammalia in food and feed.** *Meat Science*. 65: 599-607.
9. Chikuni, K., K. Ozutsme, T. Hoishikawa and S.Kato, 1990. **Species identification of cooked meats by DNA hybridization assy.** *Meat Science*. 27**:** 119-128.

10. Colombo, F., E. Marchisio, A. Pizzini and C. Cantoni, 2002. **Identification of goose species (Anser anser) in Italian mortara salami by DNA sequencing and polymerase chain reaction with an original primer pair.** *Meat Science.* 61: 291-294.
11. 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: 215-220.
12. 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 12S r RNA gene.** *Meat Science.* 70:107-112.
13. 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.
14. Gouli, Z., Z. Mingguang, Z. Zhijiang, O. Hongsheng and L. Qiang, 1999. **Establishment and application of polymerase chain reaction for the identification of beef.** *Meat Science.* 51:233-236.
15. Kesmen, Z., F. Sahin and H. Yetim, 2007. **PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages.** *Meat Science.* 77: 649-653.
16. Kocher, T.D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo and F. X.Villablanca, 1989. **Dynamics of mitochondrial DNA evolution inanimals: amplification and sequencing of conserved primers.** *Proceeding of National Academy Sciences of the United States of America.* 86.
17. Koh, M., C. Lim, S. Chua, S. Chew and S. Phang, 1998(a). **Random amplified polymorphic (DNA-RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species.** *Meat science*. 48: 275-285.
18. 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.

19. 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.
20. Partis, L., D. Croan, Z. Guo, R. Clark, T.Coldham and J. Murby, 2000. **Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats.** *Meat Science.* 54: 369-376.