۱۱-۱:(۳)۳؛۱۳۹۹ /مجله پژوهشنامه حلال مقاله پژوهشی

تعیین منشأ گربه‌ماهی، ماهی مرکب و خرچنگ در محصولات ژلاتینی به روش ژنتیکی برای اولین بار در ایران

وحیده هدایتی [۱و۲*]، عطیه خسروی[۱]، لیلی خاقانی[۲]، زهرا نقیب زاده [۱]، شکوفه دلخواهی[۱]، علیرضا هدایتی [۱]

۱- شرکت دانش بنیان دانا ژن پژوه، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

دریافت مقاله : ۴ شهریور۹۹ **پذیرش مقاله :** ۲۹ آذر ۹۹

چکیده:

مقدمه: ژلاتین یک محصول فرعی حیوانی است که از هیدرولیز نسبی بافت کلاژن بخش‌های مختلف بدن حیوانات به دست می‌آید؛ بنابراین تعیین حلیت نوع ماهی یا آبزی استفاده شده در ژلاتین، ویتامین‌های محلول در چربی، اسیدهای چرب غیراشباع و محصولات حاوی آن‌ها برای برخی مذاهب اسلامی ضروری است. امروزه در بسیاری از محصولات ژلاتینی، به‌ویژه مکمل‌ها و کپسول‌های ژلاتینی وارداتی به ایران، از ژلاتین گونه‌های مختلف خرچنگ، گربه‌ماهی و ماهی مرکب استفاده می‌شود که تاکنون روشی برای شناسایی آن‌ها گزارش نشده است.

روش کار: براساس مطالعات بیوانفورماتیکی و ژن‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی، پرایمرهای اختصاصی برای ردیابی کیفی خرچنگ، گربه ماهی و ماهی مرکب در کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌ها طراحی شدند. سپس بهینه‌سازی روش PCR انجام شد. نهایتاً DNA استخراج شده از پرایمرهای اختصاصی هریک از گونه‌ها تکثیر و بر روی ژل آگارز رویت شد.

یافته‌ها: بهینه‌سازی واکنش PCR برای پرایمرهای اختصاصی خرچنگ، گربه ماهی و ماهی مرکب انجام و به ترتیب باندهای ۱۴۷، ۱۲۴ و ۱۱۲ جفت بازی بر روی ژل آگارز رؤیت شد. اختصاصیت، پایداری و تکرارپذیری روش برای هر جفت پرایمر بررسی شد. سپس PCR با DNA های استخراج شده از کپسول‌های ژلاتینی و پرایمرها انجام شد. همچنین، توالی‌یابی باند تکثیر شده با پرایمرهای عمومی آبزیان نیز نتایج فوق را تائید کرد.

نتیجه: در این مطالعه برای اولین بار با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده اختصاصی در مدت زمانی کوتاه می‌توان ردیابی کیفی خرچنگ، گربه ماهی و ماهی مرکب را در ژلاتین یا محصولات حاوی آن نظیر کپسول‌های ژلاتینی، مکمل‌ها و کلاژن قبل از ورود به کشور انجام داد.

کلمات کلیدی: کپسول‌های ژلاتینی، خرچنگ، ماهی مرکب، گربه‌ماهی، روش PCR

*نویسنده مسئول: وحیده هدایتی، آدرس پست الکترونیکی : hedayati@halal.ac.ir، شماره تماس : ۰۲۱۸۸۹۷۸۲۶۸

view Journal

https://doi.org/10.30502/H.1399.122665

This paper is open access under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license

مقدمه:

تولید و مصرف محصولات دریایی در ایران همیشه از دیدگاه اقتصادی، مذهبی و سلامت مصرف‌کننده مورد توجه بوده است. همراه با توسعه صنایع محصولات غذایی دریایی که تنوع فراوانی نیز دارد، احتمال اینکه برخی از تولیدکنندگان متقلب و سودجو بمنظور دستیابی به سود بیشتر اقدام به جایگزینی گونه‌های حرام و کم ارزش با گونه‌هایی حلال، بازارپسند و گران قیمت نمایند، افزایش یافته است. همچنین بیشتر کالاهای قاچاق و بدون مجوز با نصب برچسب جعلی روی محصولات خود، باعث می‌شوند مصرف‌کننده بدون داشتن هیچ اطلاعی، هزینه‌ای بیشتر از ارزش واقعی بپردازد. وجود این تقلبات، لزوم نظارت بیشتر در مورد کنترل کیفی و احراز هویت گونه محصولات و فرآورده‌های ژلاتینی را تبیین می‌کند.

به موازات، امروزه از برخی ماهیان یا آبزیان هم چون گربه ماهی، ماهی مرکب و خرچنگ در حوزهٔ دارویی و تولیدات اقلام آرایشی بهداشتی استفاده می‌شود که اکثراً وارداتی بوده و از نظر برخی از مذاهب اسلامی، حلال نمی‌باشند؛ بنابراین با قوانین بعضی کشورهای اسلامی از جمله ایران مغایرت خواهند داشت. لذا نیاز مبرمی به تمهیداتی جهت شناسایی و کنترل واردات و تولیدات این فرآورده‌ها در کشور می‌باشد. امروزه حلیت محصولات ژلاتینی و کپسول‌های دارویی از نظر منشأ خوک یا گاو با روش‌های مختلف ازجمله PCR کنترل می‌شود [۱،۲، ۳،۴،۵]، ولی در مکمل‌ها و کپسول‌های دارویی حاوی خرچنگ، گربه ماهی و ماهی مرکب، تشخیص نوع آبزی صورت نمی‌گیرد؛ بنابراین در پروژه حاضر برای اولین بار در ایران با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی و ژن‌های اختصاصی گونه‌های مذکور، پرایمرهای کاملاً اختصاصی طراحی شد و بعد از بهینه‌سازی روش PCR، شناسایی منشأ آبزیان مذکور در ژلاتین، مکمل‌ها و کپسول‌های ژلاتینی به صورت کیفی صورت گرفت. شایان ذکر است این روش از صحت، تکرارپذیری و سرعت بالا برخوردار است و روشی بسیار مناسب جهت تعیین حلیت محصولات وارداتی حاوی ژلاتین، کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌ها قبل از ورود به کشور می‌باشد.

روش کار:

۱. نمونه‌های ماهی و کپسول‌های ژلاتینی

نمونه‌های ماهی و آبزیان از دانشگاه علوم و فنون دریا در استان خوزستان تهیه شد که شامل آبزیان حرام نظیر ماهی مرکب، گربه‌ماهی، خرچنگ پهن و خرچنگ دراز (لابستر) و آبزیان حلال نظیر ماهی تن، تیلاپیا، کوسه و میگو بودند. کپسول‌های ژلاتینی حاوی برخی موارد مذکور نظیر Vegapa، Arthrostop، Joint Care و چند کپسول بدون برند، نیز از مرکز تحقیقات حلال دریافت شدند.

۲. طراحی پرایمرهای اختصاصی

در ابتدا به منظور طراحی پرایمر اختصاصی از گونه‌های خرچنگ، ماهی مرکب و گربه‌ماهی، ژن‌های اختصاصی برای هرگونه و هر خانواده به‌طور جداگانه از بانک‌های اطلاعاتی NCBI دریافت شد. سپس یک ژن اختصاصی در یک‌گونه تعیین گردید و توالی این ژن از تمام گونه های مختلف و گزارش شده آن ماهی یا آبزی در بانک های اطلاعاتی ذخیره شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit این ژن‌ها هم ردیف شدند و مناطق حفظ شده آن‌ها طی تکامل مشخص گردید. به منظور تکثیر تمام

گونه‌های یک ماهی یا آبزی از مناطق حفظ شده ژن کاندید، پرایمر اختصاصی با قابلیت جداسازی هم زمان این گونه‌ها طراحی گردید (primer3 input version 0.4.0 و Oligo 7). سپس پرایمرها با آبزیان دیگر بلاست نوکلئوتیدی (BLASTn) شدند تا مشخص شود به گونه‌های ماهی یا آبزی دیگر متصل نمی‌شود. هم-چنین به منظور ردیابی DNA در محصولات ژلاتینی، کپسول‌های دارویی و مکمل‌ها که بسیار فرآوری شده‌اند، پرایمرها به نحوی طراحی شدند که طول محصول PCR آن‌ها کوتاه، بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز، باشد.

۳. استخراج DNA

DNA از گوشت ماهیان و آبزیان، کپسول‌های ژلاتینی و داروهای حاوی آن به روش CTAB (Merck, KGaA) با تغییرات جزئی استخراج شد [۶].

سپس غلظت آن ها با دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000 Spectrophotometers, Thermo Fisher) خوانده شد. از سوی دیگر، با خواندن جذب در ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ کیفیت DNA ها نیز بررسی گردید. به منظور اطمینان از عدم وجود بازدارنده در این DNA ها، واکنش PCR (BioRad C1000, USA) با پرایمرهای عمومی 18S با غلظت ۲۰-۱۰ نانوگرم DNA انجام شد و محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند (زیست‌فناوری کوثر).

۴. واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی

بعد از اطمینان از قابلیت تکثیر DNA ها، برای هر پرایمر اختصاصی PCR با شیب دمایی متفاوت گذاشته شد (BioRad C1000, USA) تا بهترین دمای اتصال برای هر جفت پرایمر بدست آید. همچنین PCR نیز بهینه سازی شد (جدول ۱). برنامه PCR با واسرشته سازی ابتدایی ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی ۲۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال با دمای اختصاصی هر پرایمر ۲۵ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ ثانیه، نهایتاً ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر نهایی در نظر گرفته شد. ازسوی دیگر، پس از بهینه سازی واکنش PCR برای هر جفت پرایمر، تکرارپذیری و صحت آن نیز بررسی شد. پایداری روش نیز با تغییر مقادیر پرایمر و بقیه مواد PCR، تغییر دستگاه PCR (Corbett CGI-96 Palm-Cycler Thermal Cycler in Golden Valley, MN, USA) تائید شد.

جدول ۱- مقادیر استفاده شده در واکنش PCR برای هر جفت پرایمر

Ingredient	Conc.	Volume(µl)
ddwater		13.59
Buffer+Mg	10X	2
dNTP	10 mM	0.26
Primer F	10 µM	1
Primer R	10 µM	1
Taq polymerase	5U/µl	0.15
Template DNA		2
Sum		20

به منظور اطمینان از اختصاصیت پرایمرها و عدم اتصال آن‌ها به گونه‌های غیراختصاصی دیگر، واکنش PCR برای هر جفت پرایمر اختصاصی با آبزیان و ماهیان پرکاربرد دیگر نیز انجام شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ تا ۲/۵ درصد الکتروفورز شدند. سپس با DNA های استخراج شده از کپسول‌های حاوی ژلاتین ماهی و پرایمرهای اختصاصی واکنش PCR انجام شد.

۵. توالی‌یابی DNA های تکثیرشده کپسول‌ها با پرایمرهای عمومی

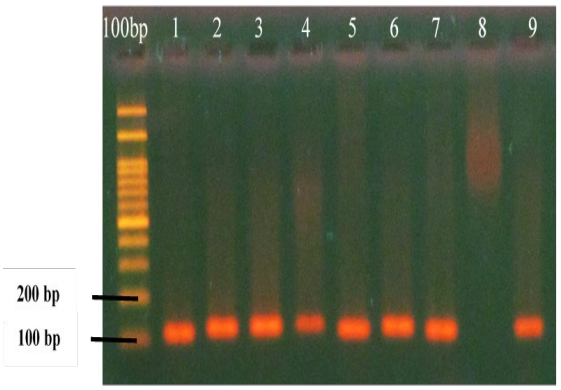
به منظور مقایسه روش استفاده از پرایمر اختصاصی و یا پرایمر عمومی، به موازات طراحی و بررسی پرایمرهای اختصاصی با DNA نمونه‌های کپسول، واکنش PCR با پرایمر عمومی ماهی‌ها نیز گذاشته شد. شایان ذکر است که پرایمر عمومی از مناطق حفظ شده یک ژن طی تکامل ماهی‌ها طراحی شده است که مطالعات بیوانفورماتیکی حاکی از آن است که این پرایمر قادر به تکثیر اکثر گونه‌های یک ماهی می‌باشد. به این منظور از ۳ جفت پرایمر عمومی ماهی با طول محصول PCR، ۲۲۴، ۱۳۷ و ۱۲۳ جفت باز استفاده شد.

۶. آنالیز بیوانفورماتیکی توالی‌ها

بلاست نوکلئوتیدی (BLASTn) محصولات PCR توالی‌یابی شده با پرایمرهای عمومی ماهی در پایگاه اطلاعاتی NCBI، انجام و جنس و گونه ماهی‌ها براساس بیشترین درصد یکسانی و تشابه تعیین گردید.

یافته‌ها:

از همه نمونه‌های مذکور، DNA استخراج شد و پس از محاسبه غلظت و خلوص DNA، جهت تائید قابلیت تکثیر DNA های استخراج‌شده، کنترل آن‌ها با پرایمر عمومی 18S با روش PCR انجام شد و نتایج الکتروفورز محصولات PCR با پرایمر 18S نشان داد که تمامی DNA های استخراج شده از نمونه‌های کنترل مثبت و ماهی‌ها، تکثیر پذیر هستند (شکل ۱) و مقادیر مورد نیاز DNA ها برای PCR با پرایمرهای اختصاصی تعیین شد.

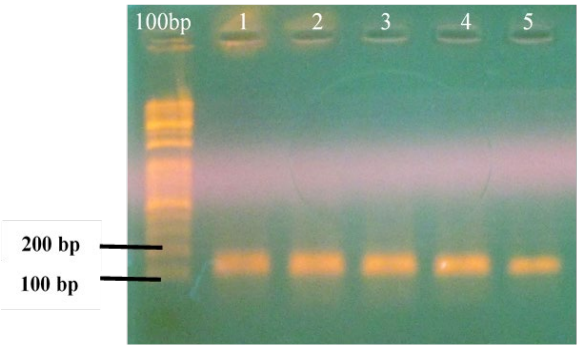


شکل ۱- تصویر الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای 18S. شماره ۱ تا ۷ به ترتیب محصولات PCR با DNA لابستر، ماهی تن، کوسه، میگو، تیلاپیا، خرچنگ، ماهی مرکب، شماره ۸ کنترل منفی و شماره ۹ محصول PCR با DNA گربه ماهی می‌باشد.

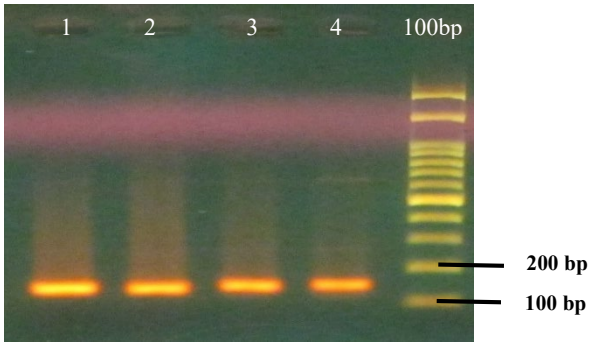
از طرف دیگر، پرایمرهای اختصاصی برای ردیابی خرچنگ، ماهی مرکب و گربه ماهی طراحی گردید. لازم به ذکر است نام علمی و توالی‌های تمام ژن‌های اختصاصی از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد.

پرایمرهای اختصاصی گربه ماهی از ناحیه حفظ شده ژن اختصاصی *COI* (KM232630.1) از ۱۰ گربه ماهی با نام علمی *Pangasius pangasiu*، *Pangasius mekongensis*، *Pangasius conchophilus*، *Pangasius bocourti*، *Pangasius larnaudii*، *Pangasius sanitwongsei*، *Pangasius krempfi*، *Pangasius nasutus*، *Pangasius elongatus* و *Pangasius macronema* با طول محصول PCR حدود ۱۲۴ جفت بازطراحی شد. به منظور طراحی پرایمر در خرچنگ از توالی ژن زیر واحد I سیتوکروم اکسیداز (JN679822.1) در *Pilodius flavus*، *Cyclodius obscurus* و گونه‌های *Brachyura* sp. *Xanthidae* sp.، *Decapoda* sp و *Alpheidae* sp.

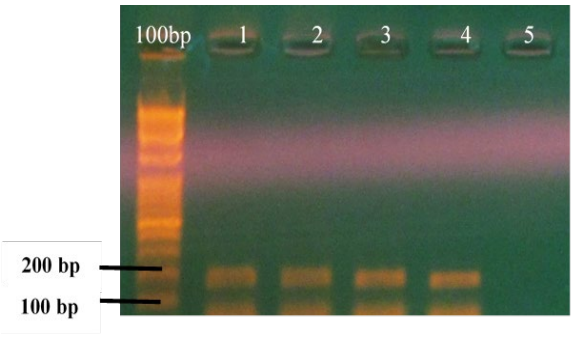
استفاده شد و از ناحیه حفظ شده طی تکامل، طراحی پرایمرها با طول محصول PCR حدود ۱۴۷ جفت باز انجام شد. همچنین برای ماهی مرکب از ژن *COI* (HM377490.1) در هشت‌پا استفاده شد، زیرا ماهی مرکب از راسته هشت‌پایان می‌باشد و ژن مذکور در ۲۱ گونه و جنس هشت‌پا با نام‌های علمی *Octopoda* sp. *Abdopus* sp.، *Octopus cyanea*، *Octopus laqueus*، *Octopus oliveri*، *Octopus maya*، *Octopus hubbsorum*، *Octopus bimaculatus*، *Octopus tetricus*، *Octopus vulgaris*، *Octopus joubini*، *Octopus membranaceus*، *Abdopus aculeatus*، *Thaumoctopus mimicus*، *Amphioctopus aegina*، *Amphioctopus ovulum*، *Amphioctopus marginatus*، *Hapalochlaena maculosa*، *Amphioctopus kagoshimensis*، *Amphioctopus membranaceus* و *Cistopus taiwanicus*، هم ردیف شد و از ناحیه حفاظت شده، پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید که طول محصول PCR حدود ۱۱۲ جفت باز را تکثیر می‌نمود. سپس واکنش PCR برای هر پرایمر اختصاصی با DNA استخراج شده انجام شد و دمای اتصال مناسب برای هر پرایمر انتخاب شد (شکل‌های ۲ تا ۴). بر این اساس دمای اتصال مناسب برای پرایمرهای اختصاصی ماهی مرکب، گربه‌ماهی و خرچنگ به ترتیب ۶۵، ۶۸ و ۶۴ در نظر گرفته شد.



شکل ۲- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۱۲ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی ماهی مرکب. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۵ به ترتیب دمای اتصال ۵۸، ۶۰، ۶۲، ۶۴ و ۶۶ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

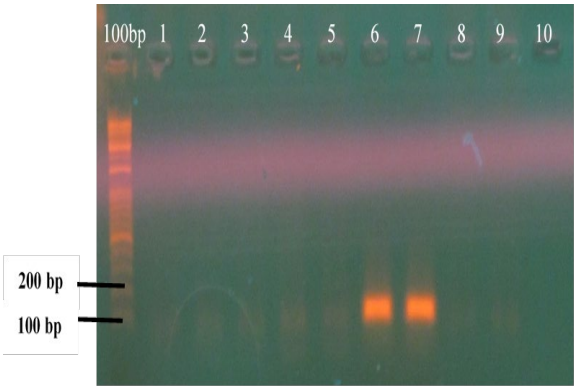


شکل ۳- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۲۴ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی گربه‌ماهی. شماره ۱ تا ۴ به ترتیب دمای اتصال ۶۴، ۶۶، ۶۸ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد و نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد.

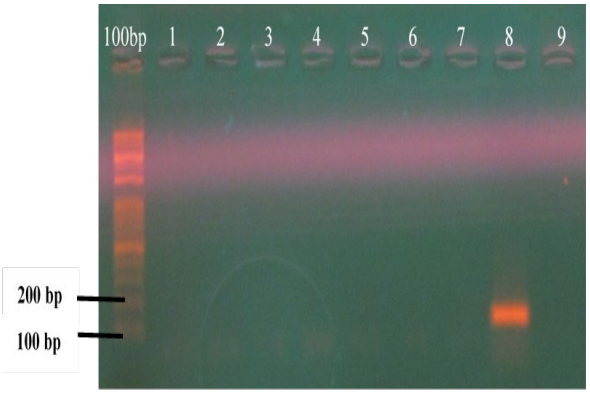


شکل ۴- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۴۷ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی خرچنگ. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۵ به ترتیب دمای اتصال ۵۸، ۶۰، ۶۲، ۶۴ و ۶۶ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

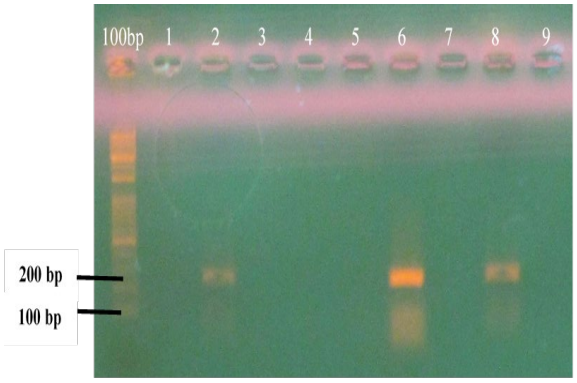
برای اطمینان از عدم اتصال پرایمرها به DNA آبزیان دیگر، ۸ آبزی پرکاربرد در مصارف دارویی و ژلاتینی شامل میگو، خرچنگ پهن، لابستر، گربه ماهی، ماهی مرکب، کوسه، ماهی تن و تیلاپیا انتخاب شدند و نتایج PCR، اختصاصیت پرایمرها را تائید نمود (شکل های ۵ تا ۷).



شکل ۵- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۱۲ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی ماهی مرکب. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۹ به ترتیب محصولات PCR با DNA ماهی تن، لابستر، کوسه، میگو، تیلاپیا، ماهی مرکب تکرار اول، ماهی مرکب تکرار دوم، خرچنگ و گربه ماهی و شماره ۱۰ کنترل منفی می باشد.

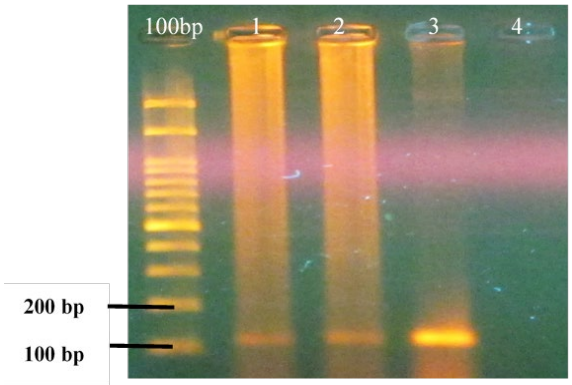


شکل ۶- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۲۴ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی گربه‌ماهی. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۸ به ترتیب محصولات PCR با دی. ان. ایی ماهی تن، لابستر، کوسه، میگو، تیلاپیا، ماهی مرکب، خرچنگ و گربه‌ماهی و شماره ۹ کنترل منفی می‌باشد.



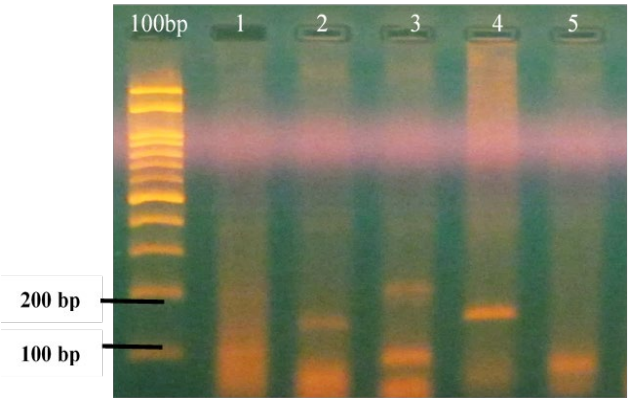
شکل ۷- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۴۷ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی خرچنگ. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۸ به ترتیب محصولات PCR با DNA ماهی تن، لابستر، کوسه، میگو، تیلاپیا، خرچنگ، ماهی مرکب و گربه ماهی و شماره ۹ کنترل منفی می‌باشد.

در بخش بعدی، برای DNA های استخراج شده از کپسول‌های ژلاتینی حاوی خرچنگ، یا گربه‌ماهی با پرایمرهای اختصاصی بهینه‌سازی شده، PCR گذاشته شد. کپسول Vegapa حاوی گربه ماهی بود و نتایج حاکی از تکثیر ژن گربه ماهی ادعا شده در این کپسول بود (شکل ۸).



شکل ۸- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۲۴ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی گربه ماهی و کپسول حاوی گربه ماهی. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۳ به محصولات ترتیب PCR با DNA استخراج شده از کپسول تکرار اول، تکرار دوم، کنترل مثبت و شماره ۴ کنترل منفی می‌باشد.

لازم به ذکر است کپسولی حاوی هشت‌پا یا ماهی مرکب یافت نشد. از سوی دیگر برای خرچنگ ۳ کپسول بررسی شدند که در ترکیبات دو کپسول (Arthrostop و یک کپسول بدون علامت تجاری) اشاره به حضور خرچنگ و میگو داشت و در کپسول استخوان ساز Joint Care اشاره به وجود ماهی و نرم‌تن دو کفه‌ایی داشت که هر سه نمونه با پرایمرهای اختصاصی خرچنگ PCR شدند. نتایج نشان داد که تنها کپسول بدون علامت تجاری با پرایمر خرچنگ باند اختصاصی داد، Arthrostop جواب نداد و Joint Care هم باند بالاتر از ۱۴۷ داد (شکل ۹). پایداری روش PCR با هر پرایمر نیز براساس جدول ۲ بررسی شد و نتایج نشان داد که باند موردنظر برای هر جفت پرایمر تحت تأثیر تغییر مقدار پرایمر، دمای اتصال، غلظت MgCl2 و dNTP، حجم واکنش و نوع دستگاه PCR قرار نگرفت. دمای اتصال یک درجه از دمای بهینه شده برای هر پرایمر کمتر و یک درجه بیشتر در نظر گرفته شد.

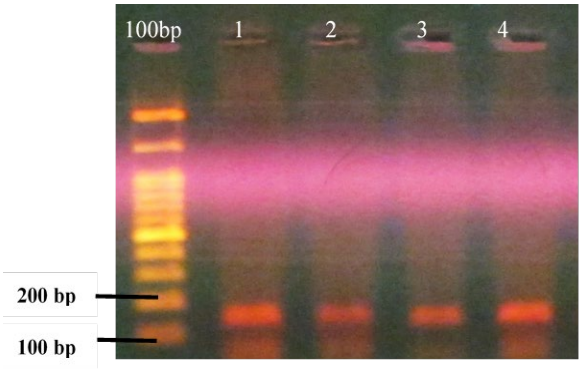


شکل ۹- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۴۷ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی خرچنگ و کپسول‌های مختلف. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۴ به ترتیب محصولات PCR با DNA استخراج شده از کپسول‌های Arthrostop، بدون علامت تجاری و Joint Care، کنترل مثبت و شماره ۵ کنترل منفی می‌باشد.

جدول شماره ۲- بررسی پایداری روش PCR با هر جفت پرایمر اختصاصی

ردیف	ترموسایکلر	غلظت آغازگر	دمای اتصال	MaCl2 (mM)	حجم واکنش (µl)	dNTP (mM)
۱	BioRad	بدون تغییر	+۱	۱/۶	۲۰	۰/۱۵
۲	BioRad	کمتر از ده درصد	+۱	۲	۲۱	۰/۲۵
۳	BioRad	بدون تغییر	-۱	۱/۶	۲۰	۰/۱۵
۴	BioRad	کمتر از ده درصد	-۱	۲	۲۱	۰/۲۵
۵	Corbett	بدون تغییر	+۱	۱/۶	۲۰	۰/۱۵
۶	Corbett	کمتر از ده درصد	+۱	۲	۲۱	۰/۲۵
۷	Corbett	بدون تغییر	-۱	۱/۶	۲۰	۰/۱۵
۸	Corbett	کمتر از ده درصد	-۱	۲	۲۱	۰/۲۵

بخش دوم پروژه تکثیر و توالی‌یابی DNA کپسول‌ها با پرایمرهای عمومی ماهی بود که به این منظور از ۳ جفت پرایمر عمومی با طول محصول PCR، ۲۲۴، ۱۳۷ و ۱۲۳ جفت باز استفاده گردید. نتایج نشان داد که پرایمرهای عمومی ماهی با طول محصول PCR، ۲۲۴ و ۱۳۷ نتوانستند DNA هیچ یک از کپسول‌ها را تکثیر نمایند. درحالی‌که DNA نمونه‌های Vegapa، Arthrostop و Joint care با پرایمر ۱۲۳ تکثیر شدند و برای توالی یابی ارسال شدند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۲۳ جفت بازی با پرایمرهای عمومی. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۴ به ترتیب محصولات PCR با DNA استخراج شده از کپسول‌های Vegapa، Arthrostop، Joint Care و کنترل مثبت می‌باشد.

آنالیزهای بیوانفورماتیک نتایج توالی‌یابی محصولات PCR با پرایمرهای عمومی ۱۲۳ نشان داد که نمونه Joint Care با ۹۱٪ تشابه به ماهی *Synodontis contractus* و با ۹۰٪ تشابه به ماهی *Phallichthys tico* به ترتیب با شماره دسترسی‌های DQ886608.1 و EF017512.1 متصل شد و به همین خاطر DNA آن با پرایمرهای اختصاصی خرچنگ تکثیر نشد. توالی‌یابی محصول PCR کپسول Vegepa با پرایمر ۱۲۳ با ۹۰ درصد تشابه به گونه *Leporacanthicus heterodon* با شماره دسترسی (KP960107.1) در پایگاه اطلاعاتی NCBI از خانواده گربه ماهی متصل شد و نتیجه PCR با پرایمر اختصاصی گربه ماهی نیز تائید شد. از طرف دیگر نتایج جستجوی توالی یابی محصول PCR کپسول Arthrostop با پرایمر ۱۲۳ در پایگاه اطلاعاتی NCBI از طریق بلاست نوکلئوتیدی نشان داد که توالی مذکور با تشابه ۸۳٪ به یک‌گونه خرچنگ با نام علمی *Ilyoplax deschampsi* و نوعی میگو با نام علمی *Macrobrachium gangeticum* و به ترتیب شماره های دسترسی JF909979.1 و AY858830.1 متصل شد که در ترکیبات آن نیز ذکر شده بود.

بحث:

شناسایی گونه ماهی و آبزیان به طور اختصاصی در ژلاتین و محصولات ژلاتینی به ویژه کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌ها در ایران و حتی جهان تاکنون انجام نشده است. شایان ذکر است منشأ ژلاتین حاوی ماهی و آبزی در بسیاری از کشورهای پیشرفته حائز اهمیت نمی‌باشد و افراد مسلمان نیز از محصولات با نشان حلال استفاده می‌نمایند که درخصوص ژلاتین و فرآورده‌های حاوی آن، تمرکز بر روی عدم استفاده از منشأ خوک می‌باشد که مقالات علمی جهت شناسایی منشأ خوک در ژلاتین نیز به روش PCR [۱، ۲، ۳ و ۴] یا آنالیتیک [۵] وجود دارد. از سوی دیگر، استفاده از بعضی ماهیان و آبزیان در برخی مذاهب اسلامی حلال نمی‌باشد؛ بنابراین شناسایی منشأ ژلاتین در بسیاری از مکمل‌ها و کپسول‌های ژلاتینی وارداتی ضروری به نظر می‌رسد. این در حالی است که مقالات علمی پژوهشی در این زمینه نیز چاپ نشده است، به‌نحوی‌که تنها چند مقاله درخصوص روش استخراج ژلاتین از پوست گربه ماهی وجود دارد [۷، ۸ و ۹].

لازم به ذکر است که شرکت Eurofins در آلمان خدماتی در زمینه شناسایی گونه ماهی در غذاهای دریایی و پیتزا ارائه می‌دهد [۱۰] و در حال حاضر نیز این شرکت کیت های استخراج ژلاتین و تشخیص منشأ خوک را با استفاده از روش Real-Time PCR ارائه می‌دهد که بسیار گران قیمت می‌باشند؛ ولی برای شناسایی منشأ ماهیان و آبزیان کیت تشخیصی ندارد. بنابراین در این پژوهش برای اولین بار در ایران و جهان، بهینه‌سازی شناسایی گربه ماهی، ماهی مرکب و خرچنگ در کپسول‌های ژلاتینی حاوی آن‌ها به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده کاملاً اختصاصی صورت گرفت. طراحی پرایمرهای اختصاصی به عنوان مهم‌ترین بخش در این پروژه محسوب می‌شود. لذا علاوه بر بررسی های بیوانفورماتیکی جهت تعیین اختصاصیت پرایمرها در شرایط آزمایشگاهی، آزمون PCR برای DNA استخراج شده از ۷ ماهی یا آبزی بسیار پرکاربرد در کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌ها شامل ماهی تن، لابستر، کوسه، میگو، تیلاپیا، ماهی مرکب، خرچنگ و گربه ماهی بررسی شدند. پرایمرهای گربه ماهی و ماهی مرکب تنها به DNA گربه ماهی و ماهی مرکب متصل شدند. ضمن اینکه پرایمرهای ماهی مرکب قادر به جداسازی ۲۱ گونه مختلف هشت پا نیز می باشد، زیرا ماهی مرکب از خانواده هشت‌پایان می باشد؛ لذا در صورت وجود هشت پا در کپسول‌های ژلاتینی نیز می توان با همین پرایمر آن را تشخیص داد. همچنین پرایمرهای خرچنگ علاوه بر تکثیر خرچنگ پهن توانستند لابستر نوعی خرچنگ دراز را نیز تکثیر نمایند. از طرف دیگر، باند ضعیفی با DNA گربه ماهی نیز دادند که در دماهای اتصال بالا این باند از بین می رفت ولی تکرارپذیر نبود. البته به دلیل اینکه گربه ماهی و خرچنگ هر دو برای استفاده برخی از مذاهب اسلامی حرام می‌باشند مسئله‌ای ایجاد نمی‌شود و در صورت نیاز به تشخیص بین گربه‌ماهی و خرچنگ، می‌توان ازپرایمرهای گربه‌ماهی استفاده نمود که به DNA خرچنگ متصل نمی‌شوند و فقط گربه ماهی را تکثیر می کند. شایان ذکر است ۱۳ کپسول مختلف با منشأهای مختلف از مرکز تحقیقات حلال دریافت شده بود که ۳ بسته کپسول Vegapa، Arthrostop و Joint care بعلاوه ۵ عدد کپسول بدون علامت تجاری، حاوی گونه های آبزی مرتبط با این پروژه بودند. Vegapa با منشأ گربه ماهی، Arthrostop و ۵ عدد کپسول بدون علامت تجاری حاوی خرچنگ و میگو بود و کپسول Joint care ماهی و نرم‌تن دوکفه‌ای در ترکیبات خود داشت که بسیار کلی و بدون ذکر جنس و گونه بود. ردیابی کیفی منشأهای گزارش شده با پرایمرهای اختصاصی حاکی از تائید روش بهینه‌سازی شده بود. ولی همزمان به منظور تائید مجدد نتایج حاصل شده، از ۳ جفت پرایمر عمومی که قابلیت تکثیر اکثر ماهیان را داشتند برای تکثیر DNA استخراج شده از کپسول‌های مذکور استفاده شد و تنها یک جفت از این پرایمرها با طول محصول PCR، ۱۲۳ جفت بازی قادر به تکثیر باند مورد نظر بود. سپس باندهای حاصل این پرایمر عمومی، توالی‌یابی شدند که بررسی‌های بیوانفورماتیکی روی نتایج توالی‌یابی نیز منشأها را تائید نمود؛ بنابراین براساس نتایج توالی‌یابی و پرایمرهای اختصاصی می‌توان اذعان داشت شناسایی منشأ گربه

ماهی، ماهی مرکب و خرچنگ با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده و روش PCR بهینه‌سازی شده می‌تواند روشی بسیار مطمئن، سریع و دقیق محسوب شود. ضمن اینکه روش توالی‌یابی باند تکثیرشده با پرایمر عمومی نیز می‌تواند در صورت لزوم و امکان، جهت تائید منشأ استفاده شود. ولی با توجه به محدودیت‌های آن و طول توالی بسیار کوتاه، با احتمال ۱۰۰٪ و به‌تنهایی نمی‌تواند برای شناسایی گونه ماهی روشی کامل باشد و نمی‌توان به صورت مطلق به آن استناد کرد. درحالی‌که استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی و ردیابی منشأ کپسول‌های حاوی ماهی و آبزیان بسیار مناسب‌تر می‌باشد و پیشنهاد می‌شود برای اطمینان و تائید، محصول PCR با پرایمر اختصاصی را به‌جای محصول PCR با پرایمر عمومی برای توالی یابی ارسال کرد تا جنس و گونه ماهی یا آبزی مشخص گردد. ضمن اینکه تعیین حد تشخیص پرایمرها (LOD) در این پروژه انجام نشده است و نیاز به استانداردهای مشخص با تعداد کپی مشخص از DNA، یا کپسول‌های با درصد مختلف آبزی به‌کاررفته دارد و انجام آن در آینده ضروری به نظر می‌رسد. ولی پایداری روش، تکرارپذیری و اختصاصیت نشان می‌دهد استفاده از این پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی کیفی منشأ ماهی مرکب، گربه ماهی و خرچنگ بسیار مناسب می‌باشند. لذا با این روش می‌توان کالاهای وارداتی حاوی این ترکیبات را قبل از ورود به کشور بررسی و صحت و سقم آن را تائید نمود.

نتیجه‌گیری:

با توجه به عدم حلیت و منع مصرف بعضی از ماهیان و آبزیان در برخی کشورها و مذاهب اسلامی از جمله ایران و این‌که امروزه بسیاری از کپسول‌های ژلاتینی و مکمل های وارداتی می‌توانند از منشا ماهی یا آبزیان غیرحلال باشند که برای برخی مذاهب اسلامی غیرقابل مصرف هستند، در این پروژه شناسایی سه آبزی پرکاربرد گربه ماهی، ماهی مرکب و خرچنگ به روش ژنتیکی انجام شد. به صورتی که برای اولین بار با طراحی پرایمرهای اختصاصی این گونه‌ها و بهینه‌سازی واکنش PCR توانستیم گونه‌های مذکور را به همراه هشت‌پا و لابستر در کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌ها تشخیص دهیم و نتایج با توالی‌یابی محصولات PCR با DNA استخراج شده از اقلام مذکور نیز تائید گردید. لازم به ذکر است تاکنون نظیر این تحقیق در ایران و جهان گزارش نشده است و با توجه به نتایج این پروژه، می‌توان گونه‌ها، مکمل‌ها و کپسول‌های ژلاتینی بیشتری را به صورت وسیع‌تر بررسی نمود. ضمن اینکه به موازات این پروژه، شناسایی ۴ گونه ماهی حلال پرکاربرد نیز به صورت مشترک با مرکز تحقیقات حلال انجام شده است.[۱۱]

تعارض منافع: نتایج حاصل از این مطالعه با منافع نویسندگان و محققان در تعارض نیست.

Research article **Journal of Halal Research/ 2020;3(3): 1-11**

Determining the origin of catfish, squid and crabs in gelatinous products by genetic methods for the first time in Iran

Vahideh Hedayati [1,2] *, Atyie Khosravi [1], Leili Khaghani [2], Zahra Naghibzadeh [1], Shokoufeh Delkhahi, Alireza Hedayati [1]

1- Dana Gene Pajouh Knowledgebase Company, Tehran, Iran
2- Halal Research Center of IRI, Ministry of Health and Medical Education,, Tehran, Iran

***Received**: 25 August 2020* ***Acceptance**: 19 December 2020*

ABSTRACT

Introduction: Gelatin is an animal by-product obtained from the relative hydrolysis of collagen tissue in various parts of the animal body. Therefore, determining the solubility of the type of fish or marine used in gelatin, fat-soluble vitamins, unsaturated fatty acids and products containing them is necessary for some Islamic religions. Today in many gelatin products, especially supplements and gelatin capsules imported to Iran, different species of crabs, catfish and squid is used, which no way to identify them has been reported.

Methods: Based on Bioinformatics studies and genes available in databases, specific primers were designed for qualitative trace crabs, catfish and squid in gelatin capsules and supplements. Then the PCR method was optimized. Finally, the extracted DNA was amplified with specific primers and detected on agarose gel.

Results: PCR reaction optimization was performed for specific primers for crab, catfish and squid, so bands 147, 124 and 112 bp were observed on the agarose gel, respectively. Specificity stability and reproducibility of the method for each pair of primers was confirmed. Then the PCR with extracted DNAs from the gelatin capsules were done with primers. Also, the sequencing of the amplified band with general aquatic primers confirmed the mentioned results.

Conclusion: In this study, for the first time, with PCR method and designed specific primers can detect the crab, catfish and squid qualitatively in gelatin or products containing it, such as gelatin capsules, supplements and collagen, in a short time, before entering the country.

Keywords: Gelatin capsules, Crab, Squid, Catfish, PCR method

*Correspondance to: Vahideh Hedayati, hedayati@halal.ac.ir, Tel: +98 21 88978268
view Journal

https://doi.org/10.30502/H.1399.122665

This paper is open access under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license

References

1. Sudjadi S, Wardani HS, Sepminarti T, Rohman A. Analysis of porcine Gelatin DNA in a commercial capsule shell using real-time polymerase chain reaction for halal authentication. Int J Food Prop. 2016, 19 (9): 2127–34.

2. Nikzad J, Shahhosseini S, Tabarzad M, Nafissi-Varcheh N, Torshabi M. Simultaneous detection of bovine and porcine DNA in pharmaceutical gelatin capsules by duplex PCR assay for Halal authentication. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017, 25:3, DOI 10.1186/s40199-017-0171-3.

3. Sepminarti, T, Sudjadi S, Wardani HS, Rohman A. Real-time polymerase chain reaction for halal authentication of gelatin in soft candy. Asian Journal of Biochemistry. 2016, 11 (1): 34-43.

4. Erwanto, Y, Rohman A, Arsyanti L, Pranoto Y. Identification of pig DNA in food products using polymerase chain reaction (PCR) for halal authentication-a review International. Food Research Journal. 2018, 25(4): 1322-1331.

5. Raja Mohd Hafidz RN, Ismail A, Che Man YB. Analytical Methods for Gelatin Differentiation from Bovine and Porcine Origins and Food Products. Journal of Food Science. 2012, 71:1.

6. Jae-Hwang L, Mi-Ra K, Cheon-Ho J, Yoo-Kyung J, Kisung K, Tae Sun K.Specific PCR assays to determine bovine, porcine, fish and plant origin of gelatin capsules of dietary supplements. Food Chemistry. 2016, 211: 253-259. DOI, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.060

7. Mahmoodani F, Sanaei Ardekani V, See SF, Yusop SM, Babji AS. Optimization and physical properties of gelatin extracted from pangasius catfish (*pangasius sutchi*) bone. *Journal of food science and technology.* 2014, 51(11):3104–3113.

8. Sai–Ut S, Jongiareonrok A, Rawdkuen S. Re–extraction, recovery, and characteristics of skin gelatin from farmed giant catfish. *Food and Bioprocess Technology.* 2012, 5(4):1197–1205.

9. Atma Y, Ramdhani H. Gelatin extraction from the indigenous Pangasius catfish bone using pineapple liquid waste Indonesian. Journal of Biotechnology. 2017, 22(2):86–91.

10. www.eurofins.com

11. Hedayati V, et al. Detection of tilapia, salmon, shark and shrimp in gelatin products by PCR method for the first time in Iran. Journal Of Halal Research. / 2020; 3(2):16-26.DOI, https://doi.org/10.30502/h.2021.245836.1047. [In Persian]