۲۶-۱۶:(۲)۳؛۱۳۹۹ /مجله پژوهشنامه حلال مقاله پژوهشی

ردیابی تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو در کپسول‌ها و مکمل‌های حاوی ژلاتین به روش PCR

وحیده هدایتی [۱،۲*]، عطیه خسروی [۱]، لیلی خاقانی [۲]، زهرا نقیب زاده [۱]، علیرضا هدایتی [۱]، فرزانه فرخی [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 : ۹ تیر ۹۹ **پذیرش مقاله :** ۲۵ شهریور ۹۹

چکیده:

مقدمه: ژلاتین از کلاژن پوست و استخوان جانوران بدست می‌آید و درصنایع غذایی، داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اهمیت حلال بودن ژلاتین مصرف شده در این محصولات، تولید و عرضه ژلاتین حلال از نظر تجارت جهانی حائز اهمیت است. امروزه حلیت محصولات ژلاتینی تنها از نظر منشا خوک یا گاو کنترل می‌شود، ولی در مواردی که منشا کپسول یا مکمل‌ها از ژلاتین ماهی و آبزی باشد، تشخیص آن‌ها صورت نمی‌گیرد.

روش کار: با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی و مطالعات بیوانفورماتیکی، پرایمرهای اختصاصی برای تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو طراحی شدند. سپس بهینه‌سازی روش PCR انجام شد. نهایتاً DNA استخراج شده از کپسول‌ها، کلاژن و مکمل‌ها با پرایمرهای اختصاصی هرگونه تکثیر و بر روی ژل آگارز رؤیت شد.

یافته‌ها: واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو به ترتیب باندهای ۱۱۳، ۱۲۲، ۲۰۰ و ۱۳۲ جفت-بازی را روی ژل آگارز نشان داد. اختصاصیت، پایداری و تکرارپذیری روش برای هر جفت پرایمر تائید شد. سپس PCR با DNA-های استخراج شده از کپسول‌های ژلاتینی و کلاژن نیز منشا آبزیان را تائید کرد.

نتیجه: در این مطالعه برای اولین بار شناسایی منشا کلاژن و کپسول‌های ژلاتینی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو با روش PCR صورت گرفت. نتایج نشان داد پرایمرهای اختصاصی قادر به تکثیر باند مورد انتظار و شناسایی منشا می‌باشند. لذا با این روش می‌توان در مدت‌زمان کوتاهی حلیت موارد مذکور را قبل از ورود به کشور بررسی، تائید یا رد کرد.

کلمات کلیدی: کپسول‌های ژلاتینی، تیلاپیا، سالمون، کوسه، میگو، روش PCR

مقدمه:

ژلاتین یک محصول فرعی حیوانی است که از پوست و استخوان گاو، پوست خوک و به میزان کمتر، پوست ماهی و مرغ تهیه می‌شود. ژلاتین در محصولات غذایی مثل ژله-ها، بستنی، شیرینی، کیک، دسرها، محصولات لبنی، داروها و لوازم‌آرایشی و بهداشتی به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. نظر به این‌که امروزه در بسیاری از محصولات ژلاتینی موجود در بازار، به ویژه کپسول‌های ژلاتینی وارداتی به ایران، از ژلاتین گونه‌های مختلف ماهی

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

view Journal

https://doi.org/10.30502/h.2021.245836.1047

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

هم استفاده می‌شود و نیز با توجه به اهمیت حلال بودن ژلاتین مصرف شده در محصولات غذایی، تولید و عرضه ژلاتین حلال نه تنها از نظر تجارت جهانی حائز اهمیت است، بلکه نگرانی‌های مسلمانان در مورد مصرف محصولات حاوی ژلاتین را نیز برطرف خواهد نمود. با توجه به آنکه مصرف برخی از گونه‌های ماهی و آبزیان از نظر برخی مذاهب اسلامی حلال نمی‌باشد، استفاده از مواد خوراکی حلال از اهمیت بالایی برخوردار است. امروزه حلیت محصولات ژلاتینی و کپسول‌های دارویی از نظر منشا خوک یا گاو با روش مولکولی و مبتنی بر PCR در ایران کنترل می‌شود [۱، ۲، ۳، ۴ ، ۵]. ولی در محصولات زیادی بخصوص مکمل‌ها و کپسول‌های دارویی از ژلاتین ماهی یا آبزیان استفاده می‌شود که تشخیص نوع آبزی امکان‌پذیر نمی‌باشد. ازسوی دیگر، در بسیاری از فروشگاه-ها فیله ماهی عرضه می‌شود که از روی گوشت آن نمی‌توان به نوع ماهی پی برد. همچنین در غذاهای دریایی یا حاوی ماهی نیز نمی‌توان نوع ماهی را مشخص نمود. لذا پروژه حاضر به‌منظور شناسایی گونه‌های پرمصرف ماهی و آبزی ازجمله تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو برای اولین بار در ایران انجام شد که بر آن اساس پرایمرهای کاملاً اختصاصی از گونه‌های مذکور طراحی شدند که قادر به شناسایی و تائید منشا کپسول‌های ژلاتینی یا مکمل‌ها با استفاده از روش مولکولی مبتنی بر PCR می‌باشد.

مواد و روش:

۱-نمونه‌های ماهی و کپسول‌های ژلاتینی

نمونه‌های ماهی و آبزی تیلاپیا، سالمون و میگو از بازار تهران خریداری شد و نمونه کوسه به همراه پرکاربردترین ماهیان و آبزیان مورداستفاده در کپسول‌های ژلاتینی برای بررسی اختصاصیت پرایمرها، نظیر ماهی مرکب، گربه ماهی، خرچنگ پهن و خرچنگ دراز (لابستر)، از دانشگاه علوم و فنون دریا در استان خوزستان تهیه شد. کپسول-های ژلاتینی یا کلاژن حاوی برخی موارد مذکور، ازجمله کلاژن تیلاپیا، کپسول Healthy in & out حاوی روغن ماهی سالمون، ArthroStop دارای میگو و خرچنگ و کپسول Shark Cratilage حاوی کوسه نیز از مرکز تحقیقات حلال دریافت شد.

۲-طراحی پرایمرهای اختصاصی

ژن‌های اختصاصی گونه‌های تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو از بانک‌های اطلاعاتی نظیر NCBI دریافت شد. برای هر ژن کلیه توالی‌های گزارش‌شده در گونه‌های مختلف آن ماهی یا آبزی انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار BioEdit این ژن‌های اختصاصی در یک خانواده هم‌ردیف شدند. با مشخص شدن مناطق حفظ‌شده ژن‌ها در طی تکامل، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد (primer3 input version 0.4.0 وOligo7) که قابلیت جداسازی یک خانواده را داشتند، ولی به گونه‌های ماهی یا آبزی دیگر متصل نمی‌شدند. برای این منظور، ژن کاندید از ماهیان یا آبزیان پرکاربرد دیگر نیز انتخاب شد و پرایمرهای طراحی‌شده به نحوی انتخاب شدند که توالی مشترکی با این گونه‌ها نداشته باشند. سپس جهت تائید اختصاصیت پرایمرها، آن‌ها با آبزیان دیگر بلاست نوکلئوتیدی (BLASTn) شدند. پس از بررسی‌های بیوانفورماتیک، پرایمرها در آزمایشگاه بهینه‌سازی و تائید شدند. ازسوی-دیگر، به‌منظور ردیابی DNA در محصولات ژلاتینی، مکمل‌ها و کپسول‌های دارویی که بسیار فرآوری شده‌اند، طراحی پرایمرها به نحوی انجام شد که محصول PCR با طول کوتاه حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز را تکثیر نماید.

۳-استخراج DNA

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

سپس غلظت آن‌ها با دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000 Spectrophotometers, Thermo Fisher) خوانده شد. ازسوی دیگر، با خواندن جذب در ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ کیفیت DNA ها نیز بررسی گردید. به منظور اطمینان از عدم وجود بازدارنده در DNA های استخراج

شده، واکنش PCR (BioRad C1000, USA) با پرایمرهای عمومی 18S انجام شد و محصولات PCR روی ژل آگارز (زیست فناوری کوثر) ۲ درصد الکتروفورز شدند.

۱. واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی

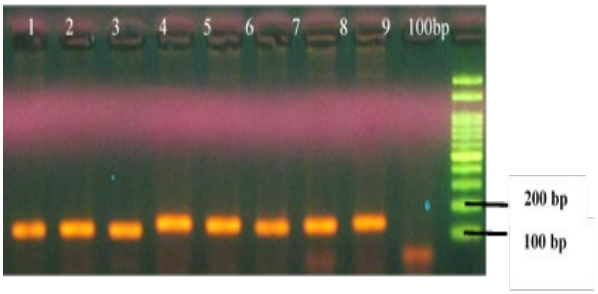
بعد از اطمینان از قابلیت تکثیر DNA ها، برای هر پرایمر اختصاصی، PCR با شیب دمایی متفاوت گذاشته شد (BioRad C1000, USA) تا بهترین دمای اتصال برای هر جفت پرایمر به دست آید و PCR نیز بهینه سازی شد (جدول ۱). آنزیم و بقیه مواد موردنیاز واکنش PCR از شرکت یکتا تجهیز آزما تهیه شد. برنامه PCR با واسرشته-سازی ابتدایی ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی 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 گرفته‌شد. ازسوی‌دیگر، پس از بهینه‌سازی واکنش PCR برای هر جفت پرایمر، تکرارپذیری، اختصاصیت و صحت PCR نیز بررسی شد و به‌منظور اطمینان از اختصاصیت پرایمرها و عدم اتصال آن‌ها به گونه‌های غیراختصاصی دیگر، واکنش PCR برای هر جفت پرایمر اختصاصی با آبزیان و ماهیان پرکاربرد در کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌ها انجام شد و محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ تا ۲/۵ درصد الکتروفورز شدند. همچنین پایداری روش با تغییر مقادیر پرایمر و بقیه مواد PCR، تغییر دستگاه PCR (Corbett CGI-96 Palm-Cycler Thermal Cycler in Golden Valley, MN, USA) نیز تائید شد. سپس با DNA های استخراج شده از کپسول‌های دارویی و پرایمرهای اختصاصی واکنش PCR انجام 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 Plimerase	5U/µl	0.15
Template DNA	20-100 ng/µl	2
Sum	Up to	20

یافته‌ها:

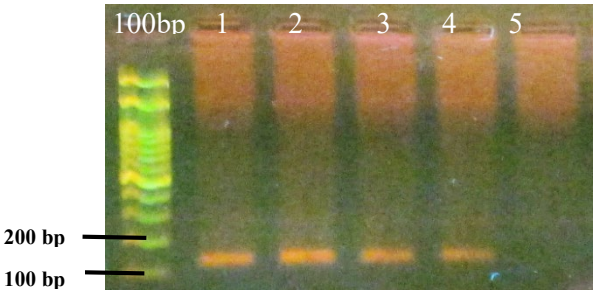
از همه نمونه‌های مذکور DNA استخراج شد و پس از محاسبه غلظت و خلوص DNA، جهت تائید قابلیت تکثیر DNA های استخراج‌شده، کنترل آن‌ها با پرایمر عمومی 18S با روش PCR انجام شد و نتایج الکتروفورز محصولات PCR با پرایمر 18S نشان داد که تمامی DNA های استخراج‌شده از نمونه‌های کنترل مثبت و ماهی‌ها، تکثیرپذیر می‌باشند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



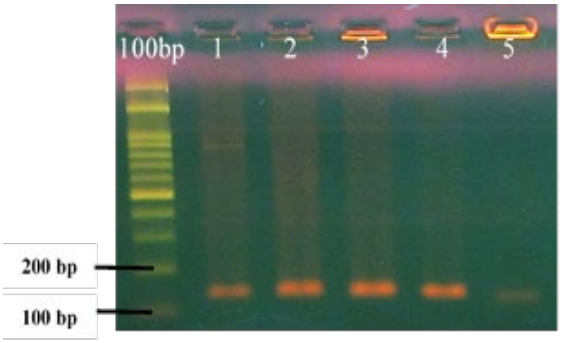
شکل ۱- تصویر الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای 18S. شماره ۱ تا ۸ به ترتیب محصولات PCR با DNA تیلاپیا، سالمون، کوسه، میگو، لابستر، خرچنگ، ماهی مرکب، شماره ۹ کنترل منفی هست.

همچنین براساس توالی‌های تمام ژن‌های اختصاصی هرگونه در پایگاه اطلاعاتی NCBI، پرایمرهای اختصاصی برای ردیابی تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو طراحی گردید. بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده به این صورت بود

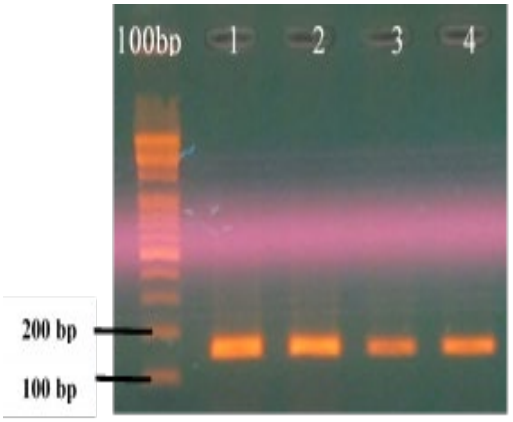
که به منظور طراحی پرایمرهای اختصاصی برای تیلاپیا، از ناحیه حفظشده ژن اختصاصی *ND2* با شماره دسترسی GQ167800.1 استفاده شد. سپس توالی این ژن در ۶ گونه تیلاپیا با نامهای علمی *Tiliapia rumeti*، *Tiliapia coffea*، *Tiliapia busumana*، *Tiliapia sparrmani*، *Tiliapia brevimanus*، *Orechromis niloticus* همردیف شد و پرایمرهای اختصاصی با طول محصول PCR حدود ۱۱۳ جفت باز طراحی گردید. پرایمرهای اختصاصی کوسه نیز از ناحیه حفظشده ژن اختصاصی *COI* با شماره دسترسی KP193298.1 در ۲۰ گونه *Negaprion Elasmobranchi* sp. *acutidens*، *Negaprion brevirostris*، *Carcharhinus amblyrhynchos*، *Carcharhinus signatus*، *Carcharhinus limbatus*، *Carcharhinus falciform*، *Carcharhinus leucas*، *Carcharhinus obscurus*، *Carcharhinus macloti*، *Carcharhinus galapagensis*، *Carcharhinus plumbeus*، *Carcharhinus tilstoni*، *Isurus oxyrinchus*، *Galeocerdo cuvier*، *Cetorhinus maximus*، *Alopias superciliosus*، *Alopias vulpinus*، *Lamna ditropis* و *Prionace glauca* با طول محصول PCR حدود ۲۰۰ جفت باز و پرایمرهای سالمون از ناحیه حفظشده ژن اختصاصی *Cytb* با شماره دسترسی JX262010.1 در ۱۳ گونه سالمون به نامهای *Salvelinus* sp. *Salvelinus curilus*، *Salvelinus malma malma*، *Salvelinus taranetzi*، *Salvelinus neiva*، *Salvelinus andriashevi*، *Salvelinus albus*، *Salvelinus confluentus*، *Salvelinus alpinus*، *Salvelinus krogiusae*، *Salvelinus elegyticus*، *Salvelinus boganidae* و *Salvelinus kuznetzovi* و یک‌گونه کاد (*Gadus morhua*) که بسیار مشابه سالمون است که در نروژ جز ماهیان پرطرفدار است. با طول محصول PCR حدود ۱۲۲ جفت باز طراحی گردید. نهایتاً پرایمرهای اختصاصی میگو از ژن *EF-1α* با شماره دسترسی GU136229.1 طراحی شد که توالی این ژن در ۱۵ گونه گزارش‌شده در NCBI با نامهای علمی *Litopenaeus vannamei*، *Penaeus monodon*، *Marsupenaeus japonicus*، *Alpheus chacei*، *Alpheus hebes*، *Alpheus saxidomus*، *Alpheus thomasi*، *Alpheus cylindricus*، *Alpheus amblyonyx*، *Macrobrachium olfersii*، *Alpheus bouvieri*، *Alpheus floridanus*، *Automate gardineri*، *Alpheus lottini*، *Macrobrachium nipponense* یافت شد و پس از همردیفی از ناحیه حفظشده، پرایمر اختصاصی با طول محصول PCR حدود ۱۳۲ جفت باز با قابلیت جداسازی همه گونه‌های میگو مختلف طراحی گردید. سپس واکنش PCR برای هر پرایمر اختصاصی با DNA استخراج شده انجام و دمای اتصال مناسب برای هر پرایمر انتخاب شد (شکل‌های ۲ تا ۵).



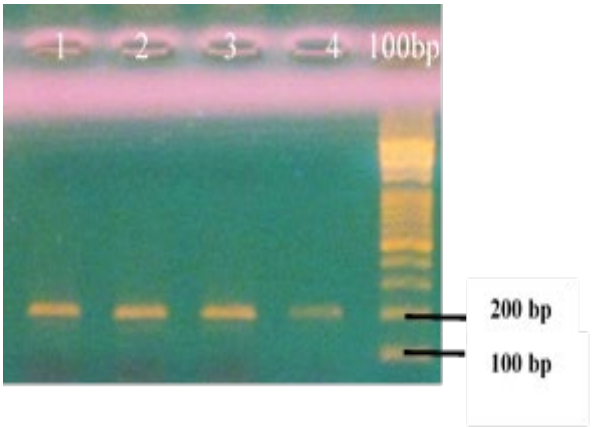
شکل ۲- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۱۳ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۵ به ترتیب دمای اتصال ۵۹، ۶۱، ۶۳، ۶۵ و ۶۷ درجه سانتی‌گراد هست.



شکل ۳- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۲۲ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی سالمون. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۵ به ترتیب دمای اتصال ۶۰، ۶۲، ۶۴، ۶۶ و ۶۸ درجه سانتی‌گراد هست.

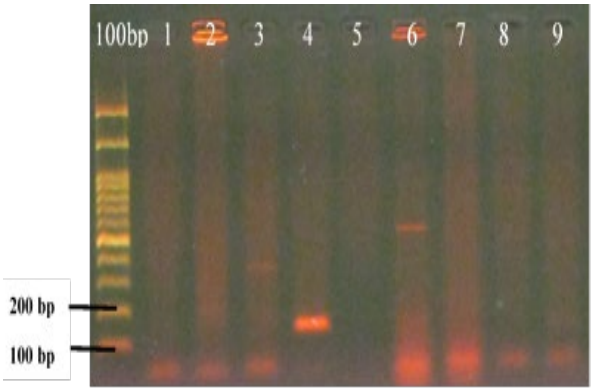


شکل ۴- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۳۲ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی میگو. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۴ به ترتیب دمای اتصال ۶۰، ۶۲، ۶۴ و ۶۶ درجه سانتی‌گراد هست.



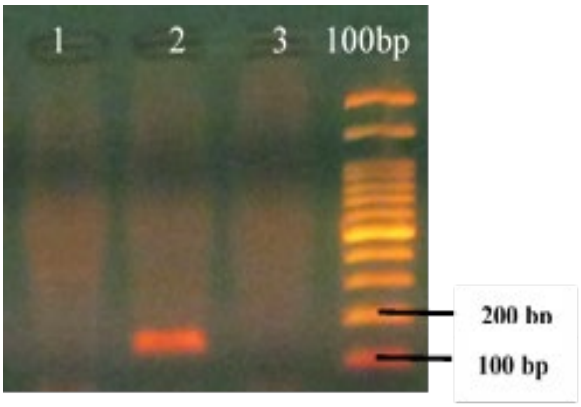
شکل ۵- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، حدود ۲۰۰ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی کوسه. شماره ۱ تا ۴ به ترتیب دمای اتصال ۵۹، ۶۱، ۶۳ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی می باشد.

با توجه به نتایج گرادیانت PCR، دماهای بهینه انتخاب شده برای پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا و کوسه ۶۳ و برای سالمون و میگو ۶۶ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. سپس جهت آزمون تعیین اختصاصیت یعنی عدم اتصال پرایمرهای اختصاصی به DNA آبزیان دیگر، علاوه بر ۴ آبزی انتخاب شده، ۴ آبزی پرکاربرد در مصارف دارویی و ژلاتینی شامل خرچنگ پهن، لابستر، گربه‌ماهی و ماهی مرکب نیز انتخاب شدند و نتایج PCR، اختصاصیت پرایمرها را تائید نمود (شکل‌های ۶ تا ۱۰).

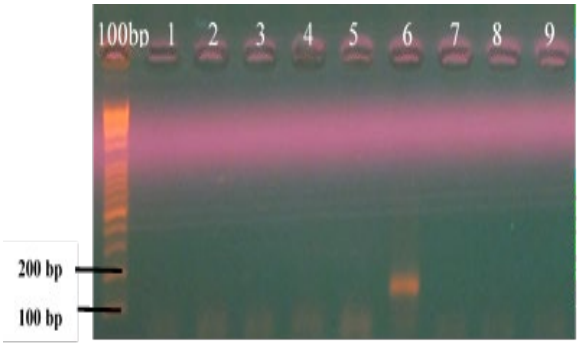


شکل ۶- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۱۳ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۸ به ترتیب محصولات PCR با DNA ماهی مرکب، لابستر، کوسه، تیلاپیا، میگو، سالمون، خرچنگ و گربه ماهی و شماره ۹ کنترل منفی هست.

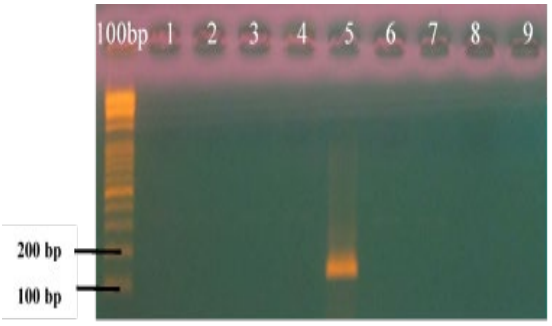
پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا در دمای اتصال ۶۳ با کوسه و سالمون باند غیراختصاصی دادند که برای از بین بردن آن دمای ۶۵ انتخاب شد و نهایتاً نتایج PCR با DNA کوسه، سالمون و تیلاپیا در دمای ۶۵ تائید شد که در شکل ۷ آمده است.



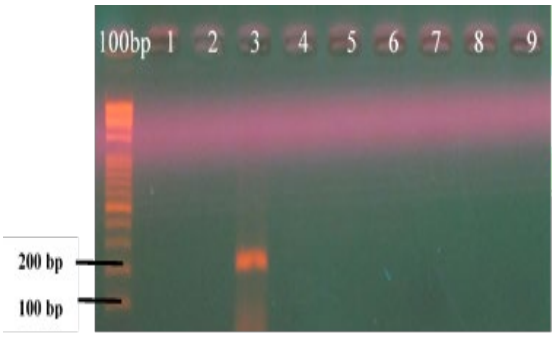
شکل ۷- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۱۳ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۳ به ترتیب محصولات PCR با DNA کوسه، تیلاپیا و سالمون می باشد.



شکل ۸- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۲۲ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی سالمون. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۸ به ترتیب محصولات PCR با DNA ماهی مرکب، لابستر، کوسه، تیلاپیا، میگو، سالمون، خرچنگ و گربه ماهی و شماره ۹ کنترل منفی می باشد.

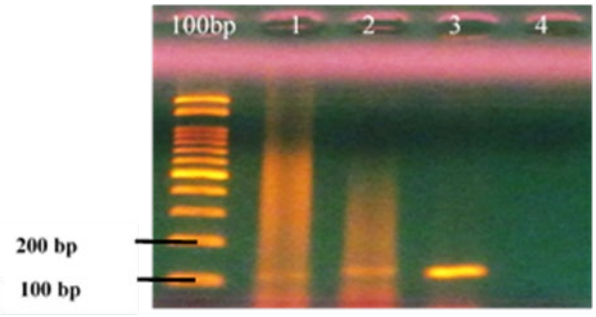


شکل ۹- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۳۲ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی میگو. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۸ به ترتیب محصولات PCR با DNA ماهی مرکب، لابستر، کوسه، تیلاپیا، میگو، سالمون، خرچنگ و گربه ماهی و شماره ۹ کنترل منفی می باشد.



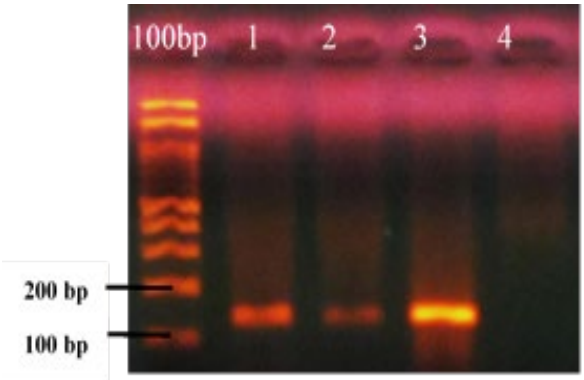
شکل ۱۰- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، حدود ۲۰۰ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی کوسه. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۸ به ترتیب محصولات PCR با DNA ماهی مرکب، لابستر، کوسه، تیلاپیا، میگو، سالمون، خرچنگ و گربه ماهی و شماره ۹ کنترل منفی می باشد.

با توجه به بهینه‌سازی پرایمرهای اختصاصی، PCR برای DNA های استخراجی از کپسول‌های ژلاتینی یا کلاژن حاوی تیلاپیا، سالمون، میگو و کوسه، گذاشته شد. کلاژن با پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا در دو تکرار، باند موردنظر را تکثیر نمود (شکل ۱۱).



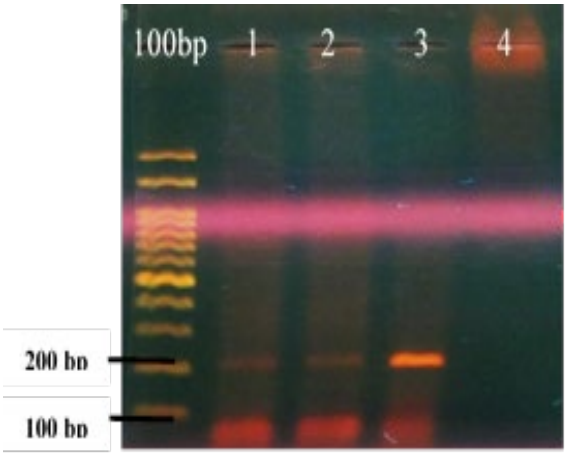
شکل ۱۱- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۱۳ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا و نمونه کلاژن تیلاپیا. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۳ به ترتیب محصولات PCR با DNA استخراج‌شده از کلاژن تکرار اول، تکرار دوم، کنترل مثبت و شماره ۴ کنترل منفی می باشد.

لازم به ذکر است کپسول Healthy in & out حاوی روغن ماهی سالمون بود و با پرایمرهای اختصاصی سالمون در دو تکرار مجزا نیز باند ۱۲۲ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۱۲).

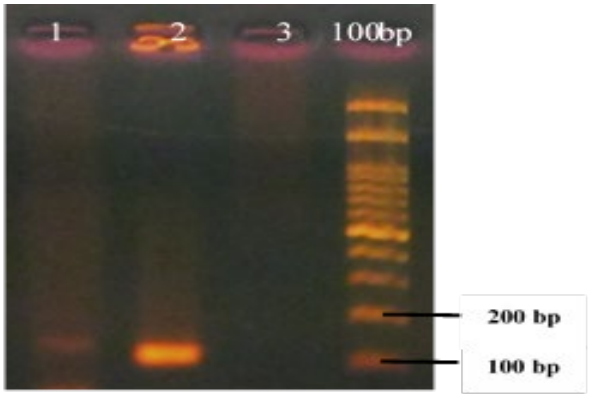


شکل ۱۲- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، ۱۲۲ جفت بازی با پرایمرهای اختصاصی سالمون. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۳ به ترتیب محصولات PCR با DNA استخراج شده از کپسول‌های Healthy in & out تکرار اول و دوم، کنترل مثبت و شماره ۴ کنترل منفی می باشد.

کپسول‌های غضروف‌ساز Shark Cratilage نیز در ترکیباتش کوسه داشت که با پرایمرهای اختصاصی کوسه نیز باند حدود ۲۰۰ جفت بازی رؤیت شد (شکل ۱۳).



شکل ۱۳- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، کوسه حدود ۲۰۰ جفت باز. نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، شماره ۱ تا ۳ به ترتیب محصولات PCR با DNA استخراج شده از کپسول Shark Cartilage تکرار اول و دوم و کنترل مثبت و شماره ۴ کنترل منفی می باشد.



شکل ۱۴- تصویر الکتروفورز محصولات PCR، میگو حدود ۱۳۲ جفت باز. شماره ۱ تا ۲ به ترتیب محصولات PCR با DNA استخراج‌شده از کپسول Arthrostop و کنترل مثبت، شماره ۳ کنترل منفی و نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، می باشد.

پایداری روش PCR با هر پرایمر نیز براساس جدول ۲ بررسی شد و نتایج نشان داد که باند مورد نظر برای هر جفت پرایمر تحت تأثیر تغییر مقدار پرایمر، دمای اتصال، غلظت $MgCl_2$ و dNTP، حجم واکنش و نوع دستگاه PCR قرار نگرفت. دمای اتصال یک درجه از دمای بهینه‌شده برای هر پرایمر کمتر و یک درجه بیشتر در نظر گرفته شد.

dNTP (mM)	حجم واکنش (µl)	$MaCl_2$ (mM)	دمای اتصال	غلظت آغازگر	ترموسایکلر	ردیف
۰/۱۵	۲۰	۱/۶	+۱	بدون تغییر	BioRad	۱
۰/۲۵	۲۱	۲	+۱	کمتر از ده درصد	BioRad	۲
۰/۱۵	۲۰	۱/۶	-۱	بدون تغییر	BioRad	۳
۰/۲۵	۲۱	۲	-۱	کمتر از ده درصد	BioRad	۴
۰/۱۵	۲۰	۱/۶	+۱	بدون تغییر	Corbett	۵
۰/۲۵	۲۱	۲	+۱	کمتر از ده درصد	Corbett	۶
۰/۱۵	۲۰	۱/۶	-۱	بدون تغییر	Corbett	۷
۰/۲۵	۲۱	۲	-۱	کمتر از ده درصد	Corbett	۸

بحث:

امروزه حلیت ژلاتین برای شناسایی منشا خوک و گاو با روش مبتنی بر PCR [۱، ۲، ۳ ، ۴] یا آنالیتیک [۵] بررسی می‌شود. از سوی دیگر، به دلیل استفاده کمتر از ماهی یا آبزیان برای تهیه ژلاتین، کلاژن یا محصولات حاوی آن، تعیین منشا اختصاصی ماهی و آبزی در محصولات مذکور در ایران تاکنون انجام نشده است.

درصورتی‌که ترکیبات اولیه بسیاری از مکمل‌ها و کپسول-های ژلاتینی حاوی ماهی یا آبزیانی است که ازنظر برخی مذاهب اسلامی حلال نمی‌باشد. لذا شناسایی منشا ژلاتین در بسیاری از کپسول‌های ژلاتینی وارداتی و مکمل‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در پروژه حاضر برای اولین بار در ایران اقدام به شناسایی منشا تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو به‌عنوان پرمصرف‌ترین آبزیان در صنعت داروسازی با استفاده از طراحی پرایمرهای اختصاصی و واکنش PCR صورت گرفت. مطالعات انجام‌شده تاکنون محدود و منحصر به موارد زیر می‌باشد، بیکر در سال ۲۰۰۲ بر روی خصوصیات ژلاتین استخراج‌شده از پوست ماهی تیلاپیا سیاه (*Oreochromis mossambicus*) و تیلاپیا قرمز (*Oreochromis nilotica*) مطالعه انجام داد [۷]. همچنین Songchotikunpan و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو روش استخراج مختلف ژلاتین از پوست ماهی تیلاپیا گونه *Oreochromis niloticus* با اسید استیک یا فورمیک اسید را باهم مقایسه نمودند [۸]. در سال ۲۰۱۸ هم خصوصیات دمایی و شیمیایی ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) توسط مارتین و همکاران بررسی شد [۹]. ازسوی دیگر، درخصوص ژلاتین استخراج‌شده از پوست کوسه هم تنها بر روی خصوصیات مختلف آن کارشده است و هیچ‌گونه تحقیقی در خصوص شناسایی منشا کوسه در ژلاتین یا فرآورده‌های آن نشده است. برای مثال مطالعات Jeevithan و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی جداسازی، تلخیص و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و فیزیوشیمیایی کلاژن نوع II و ژلاتین در کوسه (*Carcharhinus albimarginatus*) صورت گرفت [۱۰]. همچنین طبرستانی و همکاران در سال ۲۰۱۶ خصوصیات رئولوژی و فیزیوشیمیایی ژلاتین استخراج شده از پوست کوسه (*Carcharhinus dussumieri*) را بررسی کردند [۱۱]. در سال ۲۰۰۰ هم گروهی از محققان خصوصیات ژلاتین استخراجی از کوسه و خوک را باهم مقایسه نمودند [۱۲].

درخصوص ماهی سالمون نیز هیچ گزارشی مبنی بر شناسایی منشا سالمون در کپسول‌های ژلاتینی و حتی ژلاتین وجود ندارد و همه مطالعات در خصوص بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی یا آنتی‌میکروبی فیلم‌های تهیه‌شده از ژلاتین سالمون یا مقایسه با ژلاتین گاوی هست [۱۳ و ۱۴]. همچنین Fan و همکاران در سال ۲۰۱۷ استخراج ژلاتین از پوست ماهی سالمون (*Salmon salar*) را با استفاده از فرایند تریپسین انجام دادند [۱۵]؛ بنابراین پروژه حاضر باهدف تعیین منشا ماهیان و آبزیان پرمصرف در مصارف دارویی و مکمل‌ها انجام شد که مهم‌ترین بخش آن، طراحی پرایمرهای اختصاصی بود. لذا علاوه بر بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای تعیین اختصاصیت پرایمرها، هر پرایمر در شرایط آزمایشگاهی با DNA استخراج‌شده از ۷ ماهی یا آبزی بسیار پرکاربرد دیگر شامل تیلاپیا، سالمون، کوسه، میگو، لابستر، ماهی مرکب، خرچنگ و گربه ماهی بررسی شد و با تغییر دمای اتصال پرایمرها بهینه‌سازی نهایی صورت گرفت. همچنین تکرارپذیری، پایداری روش و صحت آن برای هر جفت پرایمر اختصاصی نیز تائید گردید. پرایمرهای اختصاصی تیلاپیا به نحوی طراحی‌شده‌اند که قادر به تعیین منشا ۶ گونه تیلاپیا گزارش شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI می‌باشند و فقط به DNA استخراج‌شده از تیلاپیا متصل می‌شوند. تعیین منشا کلاژن تیلاپیا با این پرایمرها در دو تکرار مجزا انجام شد و باند ۱۱۳ جفت بازی در ران محصولات PCR با DNA استخراج‌شده از این کلاژن روی ژل آگارز رؤیت شد. پرایمرهای اختصاصی سالمون نیز قادر به جداسازی ۱۳ گونه مختلف سالمون و یک‌گونه کاد می‌باشند که بسیار شبیه سالمون است و در نروژ به وفور استفاده می‌شود. این پرایمرها در واکنش PCR با DNA استخراج‌شده از کپسول Healthy in & out حاوی روغن ماهی سالمون، باند ۱۲۲ جفت بازی را تکثیر و منشا سالمون در این کپسول را تائید نمودند. همچنین پرایمرهای اختصاصی کوسه و میگو به ترتیب

قادر به جداسازی ۱۵ و ۲۰ گونه اختصاصی مرتبط بودند و توانستند منشا کوسه و میگو را در کپسول‌های Shark cartilage و ArthroStop را تائید نمایند. لازم به ذکر است کپسول ArthroStop علاوه بر میگو حاوی خرچنگ نیز بود که شناسایی منشا خرچنگ آن در مقاله هدایتی و همکاران ۱۳۹۹ (در حال انتشار) صورت گرفت و نتیجه بلاست نوکلئوتیدی با توالی باند تکثیرشده توسط پرایمرهای عمومی ماهی نشان داد که توالی مذکور با یکسانی ۸۳٪ به یک‌گونه خرچنگ با نام علمی Ilyoplax deschampsi و نوعی میگو با نام علمی Macrobrachium gangeticum و به ترتیب با شماره-های دسترسی JF909979.1 و AY858830.1 متصل می‌شود. با توجه به اینکه درصد گونه‌های بکار رفته در کپسول‌ها و مکمل‌ها گزارش نشده است، نمی‌توان حد تشخیص پرایمرهای اختصاصی را تعیین کرد. لذا پیشنهاد می‌شود درصورت وجود استانداردهای جهانی با درصدهای مختلف از موارد مذکور اقدام به انجام آزمون، جهت شناسایی حد تشخیص روش نیز نمود. ضمن اینکه در صورت وجود تمام گونه‌های آبزی و ماهی نامبرده شناسنامه‌دار، می‌توان واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده و اعضای یک خانواده را جهت تائید انجام و قدرت جداسازی و تکثیر DNA های یک خانواده ماهی یا آبزی را با یک جفت پرایمر اختصاصی نشان داد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به اینکه از نظر برخی مذاهب اسلامی مصرف همه ماهیان و آبزیان حلال نمی‌باشد و امروزه بسیاری از کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌های وارداتی با منشا ماهی یا آبزی وجود دارند که برای این مذاهب غیرقابل‌مصرف می-باشند، در این پروژه شناسایی چهار آبزی پرکاربرد در کلاژن، کپسول‌های ژلاتینی و مکمل‌ها ازجمله تیلاپیا، سالمون، کوسه و میگو به روش ژنتیکی مبتنی بر PCR انجام شد. به صورتی که برای اولین بار با طراحی پرایمرهای اختصاصی و بهینه‌سازی واکنش PCR، منشا این گونه‌ها در اقلام مذکور، تائید گردید. لازم به ذکر است تاکنون در ایران نظیر این تحقیق گزارش نشده است و با توجه به نتایج این پروژه می‌توان در مدت‌زمان کوتاه با تکرارپذیری و اختصاصیت بالا، تعیین و شناسایی منشا فرآورده‌های حاوی این موارد را انجام داد. ضمن اینکه این روش مانع از تقلبات توسط تولیدکنندگان سودجو می‌گردد و همچنین بیشتر کالاهای قاچاق و بدون مجوز نیز توسط این روش قابل‌ردیابی و شناسایی خواهند بود.

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

Research article **Journal of Halal Research/ 2020; 3(2):16-26**

Detection of tilapia, salmon, shark and shrimp in gelatin products by PCR method for the first time in Iran

Vahideh Hedayati [1,2] *, Atyie Khosravi [1], Leili Khaghani[2], Zahra Naghibzadeh [1], Alireza Hedayati [1], Farzaneh Farrokhi [1]

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

***Received**: 29 August 2020* ***Acceptance**: 26 September 2020*

ABSTRACT

Introduction: Gelatin is made from the collagen of the skin and bones of animals and is widely used in food, pharmaceutical, cosmetics. Given the importance of the halal status of gelatin used in these products, the production and supply of halal gelatin are important in terms of global trade. Today, the solubility of gelatinous products is controlled for the origin of pigs or cattle, but in cases where the capsules or supplements are from fish and aquatic gelatin, they are not detected.

Methods: Specific primers for tilapia, salmon, sharks and shrimp were designed using databases and Bioinformatics studies. Then the PCR method was optimized. Finally, the DNA extracted from the capsules, collagen and supplements were amplified with specific primers and displayed on agarose gel.

Results: PCR reaction with specific primers of tilapia, salmon, shark and shrimp showed 113, 122, 200 and 132 bp bands on agarose gel, respectively. The specificity, stability and repeatability of the method were confirmed for each pair of primers. PCR with DNA extracted from gelatin and collagen capsules also confirmed the origin of aquatic animals.

Conclusion: In this study, for the first time, the origin of collagen and gelatin capsules were identified using specific primers of tilapia, salmon, shark and shrimp and PCR. The results showed that specific primers are able to amplify the expected band and identify the source. Therefore, with this method, the solubility of the mentioned cases can be checked, approved or rejected in a short period of time before entering the country.

Keywords: Gelatin capsules, Tilapia, Salmon, Shark, Shrimp, PCR method

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

https://doi.org/10.30502/h.2021.245836.1047

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. Bakar J. Properties of gelatins from skins of fish - Black tilapia (Oreochromis mossambicus) and red tilapia (Oreochromis nilotica). Food Chemistry. 2002, 77 (1):81-84. DOI, 10.1016/S0308-8146(01)00328-4

8. Panida S, Jirarat T, Pitt S. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. International Journal of Biological Macromolecules. 2008, 42(3):247-55. DOI, 10.1016/j.ijbiomac.2007.11.005

9. O. Martins ME, R. Sosa J, L. Claudino R, O. Lino SC, Vale DA. Thermal and Chemical Properties of Gelatin from Tilapia (Oreochromis niloticus) Scale. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2018, 27 (10): 1120-1133.

10. Jeevithan E, Bao B, Bu Y, Zhou Y, Zhao Q, Wu W. Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties. Mar Drugs. 2014, 12 (7): 3852–3873. DOI, 10.3390/md12073852.

11. Shahiri Tabarestani H, Sedaghat N, Jahanshahi M, Motamedzadeghan A, Mohebbi M. Physicochemical and Rheological Properties of White-Cheek Shark (Carcharhinus dussumieri) Skin Gelatin. International Journal of Food Properties. 2016, 19 (12): 2788-2804.

12. Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, Ebato T, Nomura Y, Ishii Y, Shirai K. Physical Properties of Shark Gelatin Compared with Pig Gelatin. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 6, 2023–2027.

13. Fan HY, Dumont MJ, Simpson BK. Preparation and physicochemical characterization of films prepared with salmon skin gelatin extracted by a trypsin-aided process. Current Research in Food Science. 2020, 3:146-157.

14. Matiacevich S, Cftre DC, Schebor C, Enrione J. Physicochemical and antimicrobial properties of bovine and salmon gelatin-chitosan films. CyTA - Journal of Food. 2013, 11 (4): 366-378.

15. Fan HY, Dumont MJ, Simpson BK. Extraction of gelatin from salmon (Salmo salar) fish skin using trypsin-aided process: optimization by Plackett–Burman and response surface methodological approaches. J Food Sci Technol. 2017, 54 (12): 4000–4008. DOI, 10.1007/s13197-017-2864-5.