دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

تشخیص کمی میزان تقلبات بافتهای طیور در پودر ماهی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR

حسین ولی زاده دالنجان

شهریور ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

تشخیص کمی میزان تقلبات بافتهای طیور در پودر ماهی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR

حسین ولی زاده دالنجان

استاد راهنما

دکتر محمدرضا نصیری

اساتید مشاور

دکتر مجتبی طهمورث پور

دکتر علی اصغر اسلمی نژاد

شهریور ۱۳۹۰

ستایش مخصوص خداوندی است

که قلم را آفرید و چشمه های جوشان علم و معرفت را بر بندگانش جاری ساخت

خداوندی که مبنای تکامل انسان را

" پندار نیک، گفتار نیک و کردار نیک "

قرار داد تا مخلوق بی همتایش در مسیر رسیدن به او به بیراهه نرود .

تقدیم به

پدر فداکار و مادر مهربانم، آنان که وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر

تقدیر و تشکر از استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر محمدرضا نصیری و همچنین اساتید مشاور جناب آقایان دکتر مجتبی طهمورث پور و دکتر علی اصغر اسلمی نژاد که در طی این دوره تحصیلی و همچنین اجرای این تحقیق از راهنمائی های ارزنده شان بهره بردم

تقدیر و تشکر از دوست عزیزم جناب آقای مهندس امیر طاهری و همچنین سایر دوستانی که در تمامی مراحل این تحقیق همراه بنده بوده اند.

تعهد نامه

عنوان پایان نامه:

تشخیص کمی میزان تقلبات بافتهای طیور در پودر ماهی با استفاده از تکنیکReal time PCR .

اینجانب حسین ولی زاده دالنجان **دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی جناب آقای دکتر محمدرضا نصیری متعهد می‌شوم:**

- **نتایج ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می‌گیرم.**
- **در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.**
- **مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.**
- **کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان‌نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.**
- **حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.**
- **در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافت های آنها برای انجام پایان‌نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.**

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.

استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده:

تغذیه و امنیت غذایی بی شک یکی از مهمترین موضوع های مورد بحث دنیای امروز و سازمان تجارت جهانی است. با توجه به ارتباط مستقیم بین سلامت خوراک دام با سلامت غذای انسان، ضرورت دارد که تولید خوراک دام به عنوان حلقه ای از زنجیره ی تولید غذای انسان مورد توجه قرار گیرد. در این تحقیق پرایمر با طول bp ۹۱ از منطقه 12s rRNA میتوکندریایی طراحی و BLAST گردید و بررسی صحت آن با استفاده از نرم افزار CLC انجام گرفت. قطعه‌ی ۹۱ جفت بازی تکثیر شده از جایگاه ژنی 12s rRNA در داخل ناقل pTZ57R/T همسان سازی شد و در ادامه پلاسمید نوترکیب استخراج و به عنوان DNA استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. جهت کمی سازی نمونه ها بصورت درصد تقلب، ساخت استاندارد تقلب با استفاده از مخلوط پودر ماهی خالص و پودر بافت طیور در مقادیر ۱، ۱۰ و ۲۰ درصد انجام گرفت. نتایج با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از پلاسمید (۹۹ %= R^2) تعیین کمیت شدند. توانایی کمی سازی در این آزمایش در دامنه‌ی گسترده‌ی خطی (۵۰۰ تا ۶×۱۰^{۵} کپی) برای ارزیابی تعداد کپی‌های قطعه‌ی هدف از بافت طیور در نمونه‌های مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. معادله خطی رگرسیون با استفاده از استاندارد تقلب ترسیم گردید و درصد تقلب نمونه ها مشخص شد. نتایج کمیت سنجی نشان می‌دهد که روش Real-time PCR می‌تواند به عنوان روشی دقیق و سریع بکار گرفته شود.

کلید واژه ها: تشخیص کمی، پودر ماهی، بافت طیور، Real-time PCR، mtDNA

فهرست مطالب

۱- مقدمه ۸

۱-۱- اهمیت موضوع ۸

۱-۲- اهداف تحقیق ۱۱

۲- بررسی منابع ۱۳

۲-۱- پودر ماهی ۱۳

۲-۲- ویژگی های شیمیایی پودر ماهی ۱۵

۲-۳- مراحل آماده سازی پودر ماهی ۱۵

۲-٤- اهمیت پودر ماهی در تغذیه دام و طیور ۱۷

۲-۵- استفاده از پودر ماهی در تغذیه حیوانات ۱۸

۲-٦- پودر گوشت و استخوان ۲۰

۲-۷- تحقیقات انجام شده در این زمینه ۲۱

۲-۸- پروسه همسانه سازی ژن ۲٤

۲-۸-۱- تاریخچه همسانه سازی ژن ۲٤

۲-۸-۲- ابزارهای کار مهندسی ژنتیک ۲٤

۲-۸-۳- سایر تکنیک‌ها و استراتژی‌های همسانه‌سازی ژن ۲٦

۲-۸-۳-۱- آنزیم‌های مورد استفاده ۲۶
۲-۹- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲۷
۲-۱۰- اصول طراحی آغازگر ۲۹
۲-۱۱- TA cloning ۳۲
۲-۱۱-۱- نکات کلیدی در TA Cloning ۳۳
۲-۱۲- استفاده از آنزیم های محدودالأثر در همسانه سازی ژن ۳۳
۲-۱۳-Real-Time PCR ۳٤
۲-۱۳-۱- Real-Time PCR با استفاده از رنگ SYBR green I ۳٤
۲-۱۳-۲- کنترل های Real-Time PCR ۳۵
۲-۱۳-۳- تعیین حساسیت آنالیز Real-Time PCR ۳۸
۲-۱٤- مفاهیم Real-Time PCR ۳۹
۳- مواد و روشها ٤۲
۳-۱- جمع آوری نمونه های پودر ماهی ٤۲
۳-۲- استخراج و تعیین کیفی DNA استخراج شده ٤۳
۳-۳- مراحل انجام کار استخراج ٤٤
۳-٤- طراحی آغازگرها ٤٦
۳-۵- همسانه‌سازی قطعه مورد نظر در باکتری DH5α ٤۷
۳-۵-۱- تهیه محیط کشت باکتری ٤۷

۳-۵-۲- کشت خطی و کشت مایع باکتری DH5α ٤٨
۳-۵-۳- تهیه سلول‌های مستعد ٤٨
۳-۵-٤- انتقال پلاسمیدها به باکتری ٤٩
۳-۵-۵- غربالگری پرگنه‌ها ٤٩
۳-۵-٦- استخراج پلاسمید نوترکیب ۵۰
۳-۵-۷- تعیین کیفیت و کمیت پلاسمید نوترکیب استخراج شده ۵۱
۳-۵-۸- تأیید صحت قطعه همسانه‌شده ۵۱

٤- نتایج و بحث ۵۳

٤-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۵۳

٤-۲- بررسی محصولات PCR ۵٤

٤-۳- همسانه‌سازی قطعه مورد نظر ۵۵

٤-٤- تأیید صحت توالی همسانه‌شده ۵۷

٤-٤-۱- تعیین کمیت و کیفیت پلاسمید نوترکیب ۵۷
٤-٤-۲- نتایج هضم دوآنزیمی ۵۷

٤-۵- نتایج حاصل از Real-Time PCR ۵۸

٤-٦- نتایج منحنی های تکثیر استانداردها ۵۹

٤-۷- نتایج منحنی های تکثیری استاندارد تقلبات ۵۹

٤-۸- نتایج منحنی ذوب حاصل از نمونه ها ٦۰

٤-۹- نتایج منحنی های سایبرگرین و راکس ٦۱

٤-۱۰- رسم منحنی استاندارد ٦۲

٤-١٠- ١- محاسبه تعداد نسخه های نمونه های مجهول..... ٦٥
٤-١٠- ٢- محاسبه بازدهی تکثیر در Real-Time PCR..... ٦٧
٤-١١- منحنی استاندارد تقلبات..... ٦٨
٥- نتیجه گیری و پیشنهادات..... ٧٠
٦- فهرست منابع ٧٢

فهرست اشکال

شکل ۲-۱: شمای کلی انجام همسانه‌سازی ۲٤
شکل۲-۲- شمای کلی واکنش PCR ۲۹
شکل۲-۳: ساختارهای ثانویه آغازگرها ۳۱
شکل ۲-٤: ساختارهای ثانویه که منجر به تولید دایمر آغازگر در طی PCR میشود ۳۱
شکل ۲-۵: منحنی استاندارد جهت تعیین حساسیت Real-Time PCR ۳۸
شکل ۲-٦: نمودار تنوع در مقدار C_t..... ۳۹
شکل ۲-۷ : نمودار بررسی crossing point و رقت درReal-Time PCR ٤۱
شکل ۳-۱: مشخصات آغازگرهای 12s rRNA..... ٤۷
شکل ۳-۲: نقشه پلاسمید pTZ57R/T و مکان‌های برشی آن ۵۲
شکل ٤-۱: DNA استخراج شده وخروجی آن از نانودراپ..... ۵٤
شکل٤-۲: : تکثیر قطعه ۹۱ جفت بازی از توالی 12s rRNA در نمونه های مورد مطالعه..... ۵۵
شکل ٤-۳: کشت اسپلیت باکتری DH5α و تک کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب..... ۵۵
شکل ٤-٤: استخراج پلاسمید نوترکیب..... ۵٦
شکل٤-۵: خروجی نانودراپ اسپکتروفتو متری. ۵۷
شکل٤-٦: تأیید صحت توالی قطعه همسانه‌شده توسط هضم دوآنزیمی..... ۵۸
شکل ٤-۷: دستگاه eABI (Applied Biosystems 7300) مورد استفاده در این تحقیق..... ۵۸
شکل٤-۸: منحنی واکنش تکثیری استاندارد ها..... ۵۹
شکل٤-۹: منحنی واکنش تکثیری استاندارد تقلبات..... ٦۰
شکل٤-۱۰: منحنی ذوب. ٦۱
شکل٤-۱۱: Component plot..... ٦۲
شکل٤-۱۲: منحنی استاندارد رسم شده توسط نرم افزار ABI..... ٦۳
شکل٤-۱۳:منحنی استاندارد به همراه نمونه ها ٦٤
شکل٤-۱٤: منحنی استاندارد تقلبات ٦۸
شکل٤-۱۵: معادله رگرسیون و محاسبه درصد تقلب در نمونه ها ٦۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱: ساختار انتهای ′۳ محصولات تولیده بوسیله Taq پلیمراز ۳۲
جدول٤-۱: گزارش نتایج استانداردها ٦٤
جدول٤-۲: جدول گزارش نتایج نمونه های مجهول با استفاده از منحنی استاندارد ٦٦

فهرست علائم و اختصارات

µl	Microlitre	میکرولیتر
µg	Microgram	میکروگرم
bp	Base pair	جفت باز
DNA	Deoxyribonocleic Acid	اسید دزوکسی ریبو نوکلئیک
LB	Lauria – Bertani	لوریا- برتانی
NCBI	National center of biotechnology information	مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی
PCR	Polymerase Chain Reaction	واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
RFLP	Restriction Fragments Length Polymorphism	چندشکلی قطعه‌های حاصل هضم
RNA	Ribonocleic Acid	اسید ریبونوکلئیک
rpm	round per minute	دور در دقیقه
T/C	Template/Competitor	الگو/ رقابتگر

فصل اول

۱- مقدمه

۱-۱-اهمیت موضوع

تغذیه و امنیت غذایی بی شک یکی از مهمترین موضوع مورد بحث دنیای امروز و سازمان تجارت جهانی است. ازدیاد روز افزون جمعیت و کوشش برای فراهم آوردن احتیاجات غذایی نسل آینده الزاما برنامه ریزی صحیح و توسعه در زمینه های مختلف کشاورزی، دامداری، مرغداری، شیلات و تکنولوژی صنایع تولید خوراک را ایجاد می نماید. (اصول تکنولوژی نوین صنایع خوراک دام، طیور و آبزیان، صباحی، ۱۳۸۷)

با توجه به ارتباط مستقیم بین سلامت خوراک دام با سلامت غذای انسان، ضرورت دارد که تولید خوراک دام به عنوان حلقه ای از زنجیره ی تولید غذای انسان مورد توجه قرار گیرد. صنایع خوراک دام ، طیور و آبزیان که به طور خلاصه صنایع خوراک اطلاق میگردد، به عنوان بخش پایه در اقتصاد کشاورزی هر کشور به شمار میرود و در کشور ما نیز بخش قابل توجهی از نیروی کار و سرمایه به این بخش اختصاص یافته است.

امروزه استفاده از مواد خوراکی دامی به جهت افزایش واحدهای پرورش دام و طیور در جهت برآورده کردن نیاز روز افزون جامعه افزایش چشمگیری یافته است. از طرفی کاهش هزینه های تولید یکی از راهکارهای سوددهی بیشتر تولیدکنندگان می باشد که این راهکارها همیشه معقول ومنطقی نیستند و متاسفانه تقلب در سالهای اخیر افزایش چشمگیری داشته است که در آن از بافتهای بدن نشخوارکنندگان و طیور در پروسه تولید خوراک دام استفاده میگردد که این امر اهمیت تشخیص تقلبات را بصورت سریع و دقیق نشان میدهد و نمونه عملی آن ممنوع بودن استفاده از بافتهای دامی در تولید خوراک دام و طیور از سال ۱۹۹٤ در اتحادیه اروپاست که برای جلوگیری از بیماری هایی چون جنون گاوی، scrapie و آنفولانزای طیور اعمال می شود (میر و همکاران، ۲۰۰۳ و چنج و همکاران، ۲۰۰۱).

امروزه تشخیص بقایای بافتهای دامی در مواد خوراکی دامهای اهلی اهمیت روزافزونی یافته است. یکی از دلایل این اهمیت نقش این بقایا در گسترش برخی بیماریهاست. به عنوان مثال از زمانی که مصرف مواد آلوده توسط نشخوارکنندگان به عنوان عامل اصلی در بروز بیماری جنون گاوی (BSE) اعلام گردید قوانینی وضع گردید تا از ورود پودر گوشت و استخوان نشخوارکنندگان به جیره غذایی نشخوارکنندگان خودداری گردد (هروی و همکاران ، ۱۳۸۵).

یکی دیگر از دلایل اهمیت تشخیص بقایای بافتهای دامی در خوراک دام، اهمیت تشخیص تقلبات مواد خوراکی دامهاست. در ایران استفاده از پودر ماهی در تغذیه حیوانات گسترش روزافزونی یافته است و برخلاف گذشته که استفاده از آن فقط در صنعت طیور بوده است امروزه به خصوص در جیره گاوهای شیری به صورت گسترده تری مورد استفاده قرار میگیرد.

با افزایش تقاضا برای مصرف پودر ماهی در کشور کارخانه های متعدد داخلی نیز به تولید آن پرداخته اند.اگرچه هنوز در ایران نگرانی جدی برای بیماریهایی مثل جنون گاوی وجود ندارد با این حال یکی از نگرانی های دامداران تشخیص محصول باکیفیت و عاری از هرگونه تقلب احتمالی از جمله آلودگی به بافت طیور و نشخوارکنندگان است(هروی و همکاران ،۱۳۸۵).

بیشتر مواد غذایی مورد استفاده در تغذیه دام فرایند حرارتی را گذرانده اند و این به معنای آسیب دیدن و تغییر DNA نمونه است. با این حال مطالعات انجام گرفته ثابت کرده اند علیرغم تغییر DNA در طول فرایند حرارتی ، DNA نسبت به پروتئینها از پایداری حرارتی بالاتری برخوردار است بطوری که حتی با مقادیر بسیار کمی از DNA میتوان فرایند PCR را انجام داد(بورگر و همکاران،۲۰۰۲). از طرفی در این پژوهش بدلیل داشتن محدودیت در تعداد و مقدار نمونه و همچنین آسیب دیدن نمونه ها در طی مراحل فرآوری مواد غذایی و خوراک دام و طیور، عموما از توالی mtDNA برای تشخیص تقلب استفاده گردید. زیرا این ژنها تعداد نسخه بیشتری به ازای هر سلول (تقریبا ۱۰۰۰ نسخه به ازای هر سلول) در این نواحی نسبت به DNA ژنومی دارند و این تفاوت نیز از لحاظ آماری بسیار معنی دار است و از طرفی استخراج DNA را از مقدار کم نمونه فراهم میکند. در این بین ژنهای cyt b ، 12s rRNA و 16s rRNA از توالی mtDNA به دلیل اینکه در طی سالیان متمادی محفوظ مانده اند از شانس بیشتری جهت بررسی تقلب در مواد غذایی برخوردارند. (ابدل، ۲۰۰٦ ؛ بیلس و همکاران۲۰۰۳؛ رحمان و احمد،۲۰۰۷).

از مزایایی دیگر که استفاده از mtDNA در تشخیص تقلبات دارد میتوان به چند مورد اشاره کرد که مهمترین آنهاعبارتند از:

- اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی که در اکثر مهره داران در حدود 16kbp است و در طی فرایند حرارتی و آماده سازی مواد غذایی کمتر آسیب می بیند.

- نشان دادن وراثت مادری در اکثر گونه های جانوری.

- عدم وجود نوترکیبی در آن به دلیل هاپلوئید بودن و در نتیجه عدم تقسیم میوز .

- دارای نواحی حفاظت شده ای که اجازه شناسایی با استفاده از پرایمرهای عمومی برای تکثیر دامنه وسیعی از مهره داران را فراهم می آورند.(قوتی، ش. ۱۳۸٦).

امروزه باتوجه به پیشرفتهایی که در زمینه های بیوتکنولوژی و تکنیک های آزمایشگاهی صورت گرفته است می توان امیدوار بود که بتوان از این روشها برای تشخیص دقیق و سریع انواع تقلبات در تولید خوراک دام و طیور استفاده کرد که این امر لزوم اجرای چنین تحقیقی را در جهت حمایت از حقوق مصرف کنندگان که مبتنی بر PCR است را نشان میدهد (متسانگا و همکاران،۱۹۹۹؛ وولف و لودی،۲۰۰۱).

۱-۲- اهداف تحقیق

- تشخیص کمی تقلبات و شناسایی گونه حیوانی مورد استفاده در پودر ماهی به کمک توالی DNA میتوکندری با استفاده از تکنیک Real Time PCR.

- بهینه سازی و توسعه روش Real time PCR به عنوان روشی سریع ، دقیق و کاربردی جهت تشخیص و شناسایی تقلبات در خوراک دام و طیور.

- تعیین کمی تقلبات مواد خوراکی درموسسه استاندارد با استفاده از تکنیک Real Time PCR.

- اطمینان بیشتر مصرف کنندگان نسبت به تولید انواع خوراک دام و طیور تولیدی توسط کارخانجات داخلی.

فصل دوم

۲- بررسی منابع

۲-۱- پودر ماهی

پودر ماهی در بین مواد پروتئینی خوراک دام بهترین کیفیت و تاثیر را دارد. پودر ماهی دارای پروتئین زیاد که در مورد پودر ماهی وارداتی به ٦٠٪ هم میرسد و دارای ترکیبات مناسبی از اسیدهای آمینه می باشد و در خوراک کامل با کیفیت بالا نمی توان آن را با دیگر مواد پروتئینی جایگزین کرد. هنگام بررسی کیفیت پودر ماهی جوانب ذیل را باید مورد توجه قرار داد:

الف- رنگ وبو: پودر ماهی عادی همیشه به رنگ زرد روشن یا قهوه ای روشن است و بوی ماهی میدهد. هرچه پودر ماهی چربی اش بیشتر باشد رنگ سیرتری دارد.

ب- بعضی از افراد سودجو با روشهای غیرقانونی ناخالصی هایی را به پودر ماهی اضافی می کنند مانند کنجاله پنبه دانه، کنجاله دانه کنجد، پودر خون ، سبوس برنج و غیره. قسمتی از مواد تقلبی اضافه شده را می توان با میکروسکوپ یا روش تعلیق تشخیص داد.

ج- آزمایش شیمیایی: موارد آزمایشی عمدتا عبارتند از رطوبت، چربی خام، پروتئین خام، نمک، خاکستر خام، فیبر خام و غیره می باشد. کیفیت پودر خام شاخص مهمی برای پودر ماهی است و پودر ماهی با کیفیت بالا بایستی حاوی ٦٠٪ پروتئین خام باشد ولی نمی توان فقط با این مورد بر کیفیت نتیجه گیری کرد. گاهی نیتروژن غیرپروتئینی اوره را به پودر ماهی می افزایند که میتوان آن را با بررسی پروتئین خام تشخیص داد. اگر مواد پروتئینی مانند پودر خون و پودر پر و غیره به پودر ماهی اضافه شده باشند، میزان پروتئین خالص نیز بسیار زیاد خواهد شد که برای اثبات این مطلب بهتر است آزمایش گوارش روی دام انجام شود. از آنجا که میزان گوارش پروتئین در پودر خون، پودر پر و غیره بسیار کم است اگر میزان گوارش پروتئین در پودر ماهی کمتر از ٩٠٪ باشد می توان این طور نتیجه گیری کرد که مواد پروتئین دار دیگری را به پودر اضافه کرده اند .از لحاظ تئوری هیچ نوع فیبر خامی در پودر ماهی وجود ندارد ولی بعضی از ناخالصی های گیاهی ممکن است در طی فرایند تولید به پودر اضافه شده باشند. علی رغم موارد ذکر شده، تحت شرایط عادی میزان فیبر خام در پودر ماهی بسیار کم است پس میتوان نتیجه گیری کرد اگر میزان فیبر خام بالای ٥٠٪ باشد باید مقداری ناخالصی حاوی فیبر خام در پودر ماهی وجود داشته باشد.

میزان نمک نیز در پودر ماهی یک شاخص مهم کیفیت است. به طور کلی میزان نمک در پودر ماهی با کیفیت بالا حدود ٢٪ است. گاهی نمکی که به پودر ماهی اضافه میشود ممکن است میزان نمک را در پودر ماهی زیاد کند از این رو مزه اش تلخ و شور است و احتمالا موجب مسمومیت دام میشود.

هنگام ذخیره سازی پودر ماهی بایستی از خشک بودن آن در معرض هوا اطمینان حاصل کرد. پودر ماهی به راحتی کپک میزند و حشرات آن را میخورند یا حتی در شرایط بد ذخیره سازی کرم زده میشود. این