المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ٢، ٢٠٠٩ (٣٠٧-٣١١)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

# التمييز بين أنواع الحليب الخام من حيوانات مختلفة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل

**مثنى علي سلطان الجبوري و رعد عبد الغني السنجري**

فرع الصحة العامة البيطرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

**الخلاصة**

أجريت هذه الدراسة لتمييز الأنواع المختلفة من الحليب الخام للحيوانات المزرعية (الجاموس، الأبقار، الأغنام، الماعز) وذلك باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) وبمؤشر النوع المتخصص (Species-Specific PCR) حيث تم استخدام هذه التقنية لأول مرة في مجال صحة الحليب ومنتجاته في القطر لتحديد نوع الحليب المستخدم لحماية المستهلك صحياً واقتصادياً. تم الحصول على كمية من الدنا التي تراوحت بين (180-240) مايكرو غرام/10مل من الحليب الخام،أما قيمة النقاوة فتراوحت بين (1.88-1.75) وتم حفظ هذا الدنا المستخلص بدرجة حرارة (-20) درجة مؤية. تم إجراء هذه التقنية باستخدام مؤشر النوع المتخصص وباستخدام زوج من البادئات المتخصصة حيث بلغت الأوزان الجزيئية للحزم المتضاعفة (520) زوج قاعدي للجاموس و (365) زوج قاعـــدي للأبقار و(275) زوج قاعدي للأغنام و(400) زوج قاعدي للماعز، وتم الحصول على هذه النتائج بعد ترحيلها عن هلام الأكاروز (1.2%) ومشاهدتها بجهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية ومن ثم مقارنتها مع الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder. نستنتج من هذه الدراسة إمكانية تطبيق التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) باستخدام مؤشر النوع المتخصص Species- Specific PCR في تمييز أنواع الحليب الخام العائد للحيوانات المزرعية المختلفة وذلك لدقة هذه التقنية وحساسيتها العالية في كشف الحليب المغشوش وفائدتها في حماية المستهلك صحيا وتجارياً.

# Differentiation between types of raw milk from different animals by using polymerase chain reaction technique

**M. A. S. AL-Juborry and R. A. Al-Sanjary**

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, University of Mosul , Mosul, Iraq

**Abstarct**

This study were designed to differentiate various domestic animals raw milk (Buffalo, Cow, Sheep, Goat) by using Species Specific Polymerase Chain Reaction technique. The technique was applied in this study for 1st time in our country in milk hygiene field in an attempt to protect the health of Iraqi consumers and their economics. The average quality of genomic milk's DNA extract from (10) animals of each Species were (180-240) microgram / 10 ml while purity was about (1.75-1.88) of all extracted DNA. The study shows that there was a different amplified bands between different studied animal species and weighted (520) bp for Buffalo; (365) bp for Cow; (275) bp for sheep and (400) bp for goat compared with standard bands of the DNA Ladder on (1.2%) of agarose gel by using UV Transilluminator apparatus. The results of this study indicated that there is a possibility of using polymerase chain reaction, species specific PCR markers to differentiate different types of raw milk awing to different animals, due to the accuracy and high sensitivity of this technique. The technique asses in preventing adulteration of milk and milk product and also to protect consumers for health and economic reason.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

**المقدمة**

الحليب سائل طبيعي ناتج من إفراز غدد الثدي لأنثى الإنسان والحيوانات الثديية و يعد الغذاء الأول الذي يتناوله المولود بعد ولادته مباشرة، سواءً كان الإنسان أو الحيوانات الثديية (1) حيث يحتوي على العديد من العناصر الغذائية المفيدة والتي تختلف نسبها من نوع إلى آخر باختلافات طفيفة (3،2). وقد أصبح تصنيف المنتجات الغذائية ذات المصدر الحيواني من الأمور المهمة (4) لصحة الغذاء، ومن ثم لصحة المستهلك، وعليه فقد تم اتخاذ قوانين صارمة ضد مزج الحليب والمنتجات الحيوانية الأخرى لما له من أضرار صحية واقتصادية على المستهلك (5).

استخدمت طرق وتقنيات عديدة للسيطرة على الغش في الحليب وتمييز الأنواع المختلفة منه (6) منها الطرق الكروماتوغرافية (Chromatographic Methods) (8،7) و طريقة HPLC (High performance liquid chromatography) (9) وطريقة electrophoretic (10)، والطرق المناعية (11) وطريقة تثبيط الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) (Enzyme linked Immune sortant assay) (12) وطريقة isoelectric focusing (IEF) (14،13) وطريقة capillary electrophoresis (15) وطريقة Matrix assisted laser (16).ولكن التقدم والتطور في مجال التكنولوجيا الحيوية (Biotechnology) كانت ممهدا كبيرا لاكتشاف تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا(PCR) والتي تم استخدامها في مجال الكشف عن عائدية الأغذية ومنها الكشف عن مصدر الحليب وجودته (18،17)، حيث تعتمد هذه التقنية على مضاعفة الدنا خارج جسم الكائن الحي حيث يتم الحصول على ملايين النسخ في غضون ساعات وذلك بارتباط البادئ على الموقع المكمل له في الشريط المفرد للدنا القالب وتعد هذه التقنية سريعة ودقيقة وذات حساسية عالية مقارنة مع الطرق السابقة (19).

ولعدم وجود دراسات سابقة في القطر حول تمييز الحليب ومنتجاته للحيوانات المزرعية المختلفة باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا (PCR) ارتأينا القيام بهذه الدراسة وهي الأولى في القطر في مجال تمييز الحليب وخصوصا بين أنواع الحليب الخام لحيوانات المزرعة المعروفة (الجاموس، الأبقار، الأغنام، الماعز).

**المواد وطرائق العمل**

**جمع العينات و استخلاص الدنا**

تم جمع (١٠) عينات من الحليب الخام لكل من حيوانات المزرعة (جاموس، أبقار، أغنام، ماعز) وكانت جميعها تتمتع بصحة جيدة حيث تم جمعها في أنابيب مختبريه معلمة ومعقمة وذلك بعد تعقيم سطح الضرع بالمواد المعقمة وتم استخلاص الدنا من عينات الحليب الخام لكل حيوان من الحيوانات المشمولة بالدراسة وذلك اعتماداً على طريقة (20). وحفظت في درجة حرارة (20-) م° لحين إجراء التجارب لاحقا. بعد أن تمت ملاحظة حزم الدنا ومشاهدتها على هلام الأكاروز والتأكد من وجودها تم بعدها حساب تركيز الدنا بواسطة جهاز قياس الكثافة الضوئية أو مطياف الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 260 و 280 نانومتر.

**تحضير تفاعلات مؤشر النوع المتخصص Species specific PCR**

تم إعداد تفاعلات Species-Specific PCR حسب طريقة(21،14) باستخدام زوج من البادئات لكل نوع من أنواع الحيوانات المشمولة بالدراسة كما في الجدول رقم (١) والتي تم تصميمها في معهد علوم الحليب في جامعة يوستس – ليبك –كيسين في ألمانيا حسب طريقة (21).

الجدول(١) يبين تتابع البادئات لأنواع حليب الحيوانات المستخدمة في الدراسة

| اسم البادئ Mt-cyt b | رقم البادئ F/R | تتابع البادئ 5´----------3´ |
|---|---|---|
| الأغنام | الأول | ATT AGT CAA TGT ATA TTC TGA ATC TTA GG |
| | الثاني | GAG GTT ATT TTC GAT AGT GCT AGC TAC |
| الجاموس | الأول | ACA CGT AGG ACG CAT ATA C |
| | الثاني | CCA TTC AGG CTT GAT GTG G |
| الماعز | الأول | CAT ACA TAT CGG ACG AGG TC |
| | الثاني | GTA ATA TTA GAA CAA GAA TTA GTA GC |
| الأبقار | الأول | GCC AAT TGC TAT GAT GAT AAA TGG A |
| | الثاني | GGC TTA TAT TAC GGG TCT TAC ACT |

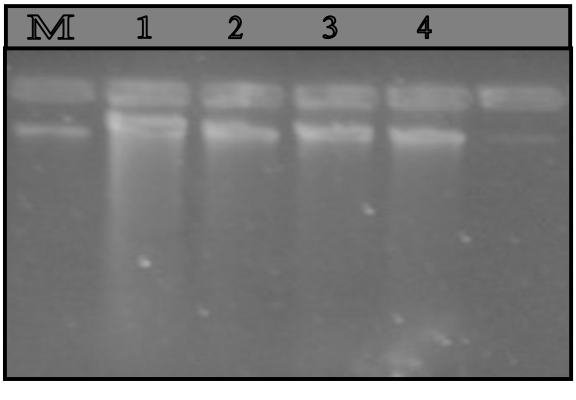
يضاف 2 مايكروليتر من الدنا المستخلص من الحليب إلى الأنابيب الحاوية على مزيج التفاعل (٢٣ مايكروليتر)، فيصبح حجم المحلول 25 مايكروليتر في كل أنبوبة بينما تحتوي أنبوبة السيطرة على جميع المواد (المحلول المنظم، القواعد النيتروجينية منقوصة الأوكسجين، البادئات، إنزيم البلمرة) ماعدا الدنا.

تنبذ الأنابيب في جهاز الطرد المركزي الدقيق لعدة ثوان و توضع في جهاز المبلمر الحراري الحلقي بعد أن يبرمج على البرنامج الخاص بالتفاعل لكل حيوان (٩٤ °م لمدة ٤ دقيقة) (دورة واحدة) و(٩٥ و٥٢-٥٩ و٧٢ °م كل منها لمدة دقيقة) (٣٠ دورة) و (٧٢ °م لمدة ٧ دقيقة) (دورة واحدة).

ترفع الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري بعد انتهاء الوقت و يتم سحب أكبر جزء من العينة وتمزج مع 3مايكروليتر من محلول التحميل مع دليل حجمي Ladder 100 bp لترحيلها على هلام الأكاروز بتركيز 1.2% لمدة 3 – 4 ساعة، يصبغ الهلام بصبغة بروميد الإثيديوم و يصور الهلام باستخدام كاميرا رقمية ثم تقدر الأحجام الجزيئية لقطع الدنا المتضاعفة المتخصصة لعينات الحليب مقارنة مع مواقع الحزم ذات الأوزان الجزيئية المعروفة للدليل الحجمي اعتمادا على (22).

**النتائج**

بلغت كمية الدنا كمعدل تراوح بين 180 – ٢٤٠ مايكرو غرام / ١٠ مل من الحليب المأخوذ من عشرة حيوانات لكل نوع من أنواع الحيوانات المشمولة بالدراسة، أما نقاوة الدنا المستخلص من عينات الحليب تراوحت بين (1.75-1.88). وللتأكد من عملية عزل الدنا واستخلاصه المجين من العينات المدروسة تم ترحيل كمية منه مع دنا لامبدا السليم (غير المهضوم) كما في الشكل (1).

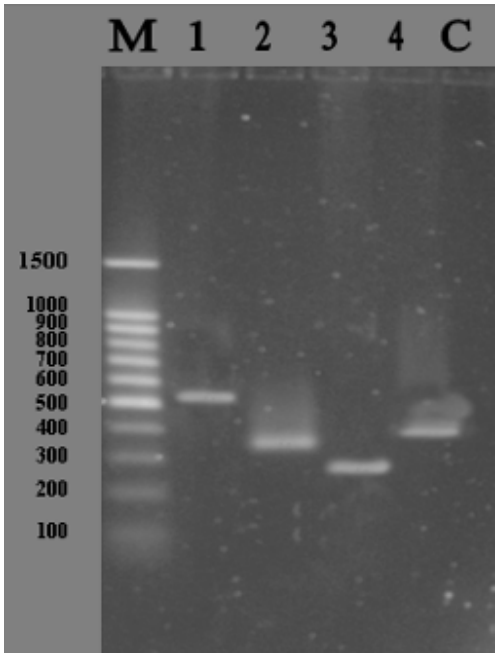



شكل (1) يمثل عزل الدنا (١و ٢و ٣ و٤) من عينات الحليب الخام للحيوانات المشمولة بالدراسة مع M الدليل الحجمي.

**نتائج تفاعلات مؤشر Species-specific PCR**

في هذه الدراسة تم استخدم مؤشر النوع المتخصص الخاص لكل نوع من أنواع حيوانات المزرعة (جاموس، أبقار، أغنام، ماعز) باستخدام زوج من البادئات لكل منها وتم عن طريقها التوصل إلى حزم خاصة لكل نوع من أنواع الحيوانات الخاصة بالدراسة وبأوزان جزيئية مختلفة والتي تم حسابها بمقارنتها مع الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder استناداً على الطريقة التي ذكرها (٢٢) وكما في الجدول (٢).

أظهر الشكل (2) وجود حزمة واحدة لكل من عينات الحليب لجميع الأنواع المشمولة بالدراسة من خلال استخدام البادئ الخاص الجاموس والأبقار والأغنام والماعز بنوعيه الأول والثاني مع المواد الأخرى في خليط التفاعل الرئيس حيث بلغ الوزن الجزيئي لهذه الحزم الخاصة 520و 365 و 275 و 400 زوج قاعدي على التوالي كما في الجدول (2) مع عدم وجود أي تضاعف في معاملة المقارنة السالبة لجميع الأنواع والمرحلة مع الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder 100bp.




شكل (٢) يوضح نتائج تضاعف دنا حليب الحيوانات المشمولة بالدراسة حيث يمثل M المؤشر القياسي و1 حزمة حليب الجاموس و 2 حزمة الأبقار و 3 حزمة الأغنام و4 حزمة الماعز والمرحلة جميعا على هلام الأكاروز 1.2 %.

الجدول (٢) يوضح نواتج الأوزان الجزيئية لحزم الدنا المتضاعف والخاص بالحيوانات المشمولة بالدراسة.

| الوزن الجزيئي (زوج قاعدي) | الجاموس | الأبقار | الأغنام | الماعز |
|---|---|---|---|---|
| 520 | + | − | − | − |
| 365 | − | + | − | − |
| 275 | − | − | + | − |
| 400 | − | − | − | + |

(+) وجود حزمة، (−) عدم وجود حزمة.

**المناقشة**

يعد تمييز الأغذية والتعرف على عائديتها ولاسيما الحليب ومنتجاته، من الأمور المهمة التي أخذت اهتماماً واسعاً في السنوات الأخيرة وذلك لتجنب بعض المشاكل التي قد يتعرض لها المستهلك، مثل حساسيته تجاه أنواع معينة من الحليب فضلاً عن الأمراض المشتركة التي تنتقل عن طريق الحليب وكذلك الخسائر الاقتصادية (23). وفي السنوات الأخيرة تم استخدام التقانات المعتمدة على مؤشرات الدنا لتمييز عائدية المنتجات الغذائية (24) مثل تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل حيث تعد هذه التقنية من أفضل الطرق المستخدمة في تمييز الأغذية و عائديتها لكونها من التقنيات المعتمدة عن الدنا الثابت في درجات الحرارة العالية فضلا عن عدم تأثر الدنا بالمدة الزمنية على عكس البروتينات التي أعتمد عليها في الطرق السابقة والتي تتلف بالحرارة (4،19).

في هذه الدراسة تم استخدام زوج من البادئات الخاصة والمصممة على جين السيتوكروم (b) في مجين المايتوكوندريا والخاصة بكل نوع من أنواع الحيوانات المشمولة بالدراسة، إذ وجد بأنه عند استخدام زوج البادئات الخاصة بحيوان الجاموس تم الحصول على حزمة متضاعفة وبوزن جزيئي bp (520) في حين لم يتم الحصول على أي حزمة متضاعفة عند استخدام نفس البادئ في دنا الأبقار والأغنام والماعز، أما بالنسبة للأبقار فانه تم الحصول على حزمة متضاعفة خاصة بها وبوزن جزيئي bp (365) وذلك عند استخدام زوج البادئات الخاصة بالأبقار في حين لم يحصل أي تضاعف في دنا حليب الجاموس والأغنام والماعز عند استخدام نفس البادئات الخاصة بالأبقار.أما بالنسبة للأغنام فقد تم الحصول على حزمة متضاعفة وبوزن جزيئي bp (275) وذلك عند استخدام زوج البادئات والخاصة بها في حين لم يحصل أي تضاعف في دنا حليب الجاموس والأبقار والماعز.وأخيرا بالنسبة للماعز فقد تم الحصول على حزمة متضاعفة وبوزن جزيئي bp (400) عند استخدام زوج البادئات الخاصة بالماعز في حين لم يحصل أي تضاعف في دنا حليب الجاموس والأبقار والأغنام، وهذا يبين أن البادئات الخاصة بكل نوع لا ترتبط إلا بالموقع المكمل لها على الشريط المفرد للدنا القالب لنفس النوع (25). وفي دراسة للتمييز بين حليب الجاموس والأغنام تم الحصول على حزم متضاعفة بوزن جزيئي (603) زوج قاعدي و (374) زوج قاعدي على التوالي عندما استخدم (26) بادئات مغايرة لأزواج البادئات التي استخدمت في دراستنا وهذا مطابق لما ذكره (27) بان حجم القطعة المتضاعفة يعتمد على تصميم البادئ وارتباطه مع الدنا القالب وذلك بالمنطقة المحصورة بين البادئ الأمامي والخلفي، ففي دراسة من قبل (Joana) وآخرون (28) تم الحصول على حزمة متضاعفة بوزن جزيئي (157) زوج قاعدي خاصة بالماعز و(274) زوج قاعدي خاصة بالأبقار و (660) زوج قاعدي خاصة بالأغنام وذلك عند استخدام البادئات المصممة على جين (Cytochrome Oxidase) في حين كانت الحزمة المتضاعفة (223) زوج قاعدي بالنسبة للأبقار وذلك عند استخدام البادئات الخاصة والمصممة على جين ( 12 S RNA) (29).

إن جميع نتائج الحزم المتضاعفة التي تم الحصول عليها والتي تختلف في قيمة أوزانها الجزيئية وذلك حسب تصميم البادئ مطابقة لما ذكره (Dalmasoo) وآخرون (30) والذي بين بان نوع الجين الذي يصمم عليه البادئ له تأثير على حجم القطعة المتضاعفة.

أما بالنسبة لعينة المعاملة السالبة (C) (Negative Control) والتي تحوي جميع المواد عدا الدنا فانه لم يحصل فيها أي تضاعف في جميع التفاعلات وذلك لعدم وجود الدنا وهذا مطابق لما ذكره (31،32) بان الدنا هو الأساس لحصول عملية التضاعف.

**الشكر والتقدير**

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

**المصادر**

1. Harding F. Milk Quality. 1st edition published by Blackie Academic and Professional and improvement of Chapman and Hall Wester and cleddens road , 1995.
2. Alan Narnam H , Jan Juther Land P. Milk and Milk Product. 1st edition. published by Chapman and Hall , 1994.
3. Kittivachra R, Sanguandeckut R, Sakulbumrungsil R, Phosngphanphance P, Srisomboon J. Determination of essential nutrients in raw milk. J Sci Technol, 2006; 28: 115-120.
4. Branciari R , Nijman I J , Plas M E , DiAntonio E , Lenstra J A. Species origin in Italian mozzarella cheese and Greek Feta Cheese. J Food Prot. 2000;63:406-411.
5. European commission.Ec 213/2001.Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. Off. J Eur Comm. 2001; 44.237/37-l37/99.

6. Rodriguez E , Martin R , Garcia T , Azcona J I , Sanz B , Hernandez PE. Indirect Elisa for detection of goats milk in ewes and cheese. Int J Food Sci Technol,1991;26(5):457-465.
7. Farag R S, Hewedi M M, Ato-Raya S H, Khalifa H H. Detection of cow milk and mixture to buffalo milk. J Amer Oil Chem Soc.1984;61: 913-916.
8. Pellegrino L , De Noni I , Tirelli A , Resmini P. Detection of cow milk in non-bovine cheese by HPLC of whey proteins. Sci Techn Latt Cas. 1991;42: 87.
9. Chen R K , Chang L W , Chung Y Y , Lee M H , Ling Y C. Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrum. 2004;18(10):1167-71.
10. Cartoni G, Coccioll F, Josionowska R, Masei M. Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. J Chromatogr A. 1999;84 (1-2): 135-41.
11. Addeo F, Nicolai M A, Chianese L, Moio L , Spanga Musco S, Bucca A ,Delgiovine L A. Control method to detect bovine milk in ewe and ovine water buffalo cheese using immunoblotting. Milchwissenschaft. 1995; 50:83-85.
12. Rodriguez E, Rosario M, Teresa G, Isabel G, Paloma M, Bernobe S, Pablo H E. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by a sandwich Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). J Sci Food and Agricu. 2006 ; 61:175-180.
13. Addeo F, Moio L, Chianese L, Stingo C, Resmini P, Berner I, Krause I, Di Loccia A , Bocca A. Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and / or caprine cheese by gel isoelectric focusing of betacaseins. Milchwissenschaft. 1990;45:708-711.
14. Meyer R, Hofelein C, Luthy J, Candrian V. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. J AOAC Int. 1995;76(6):1542-1551.
15. Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, Williams JHH. Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. J Dairy Sci. 2004;87:543-549.
16. Cozzolino R, Passalacqua S, Salemi S, Malvarya P, Spina E , Garozzo D. Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. J Mass Spectrom . 2001;36(9):1031-7.
17. Sun YL, Lin CS. Establishment and application of a flourescent polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine and bovine meat. J Agric Food Chem. 2003;52:1771-1776.
18. Wang R F, Maders M J, Campbell W, Cau W, Paine D, Cerniglia C E. A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. Mol Cell Probesles. 2000; 14:1-5.
19. Maria F, Ivan B, Valtka CC, Pietro P, Gian FG , Giuseppe E. Detection of Adulteration in Italian Mozzarlella cheese using mitochondrial DNA templates as bio markers. Food Technol Biotechnol. 2005;43(1): 91-95.
20. Lipkin E, Shalom A, Khatib H, Soller M, Friedmann A. Milk as a source of deoxyribonucleic acid as a substrate for the polymerase chain reaction. J Dairy Sci. 1993;76:2025-2032.
21. Bottero MT, Civera T, Anastasio A, Furi RM, Rosati S. Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. J. Food Prot. 2002;65:362-366.
22. Sambrook J, Fritch E F, Maniatis J. Moleculer cloning, a laboratory manual. 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
23. Bottero M T, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows' goats' and sheeps' milk in dairy products. Int Dairy J. 2003;13:277-282.
24. Pfeiffer I, Burger J, Brenig B. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. BMC Genet. 2004; 5: 3-35.
25. Kamel Abd-Elsalem A. Bioniformatic tools and guide line for PCR primer design. African Journal of Biotechnology 2:91-95. ,Determination of essential nutrients in raw milk. J Sci Technol. 2003;28:115-120.
26. Abdel-Rahman JM, Ahmed MM. Rapid and Sensitive identification of buffalos', cattles' and sheeps' milk using Species specific PCR and PCR-RFLP techniques. Food Control.2007;18: 1246- 1249.
27. Newton CR, Grahom A. PCR, parts: Basic principles and method. Eng Bios scientific publishers, oxford ,1995.
28. Joana S, Paulo F, Ronald B. Portuguese "PDO" cheese and species origin of milk. Electronic Journal of Environmental, Agricul Food Chem (EJEAF Che). 2004;2(4):476-479.
29. Lopez-Calleja I, Fajardo V, Rodriguez M A, Hervandez D E, Garcia J , Mantin R. Rapid detection of cows' milk in sheep and Goats' milk by species specific polymerase chain reaction. J Dairy Sci. 2004;67: 2839-2845.
30. Dalmasso A, Fontanella E, Piatt P, Civera T, Rosat S, Bottero M T. A multiplex PCR assay for identification of animal species in feed stuffs. Mole Celluler Probes. 2004;18:81-87.
31. Brown T A. Cloning. 3rd edition. Published by Chapman and Hall.,1997.
32. Kianz P. The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitation. Biochem Biophys Acta. 2000;1494:23-27.