الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم علوم الأغذية

الكشف الجزيئي النوعي والكمي عن البروتينات الحيوانية والنباتية الداخلة في اللحوم المصنعة في الأسواق السورية

Quantitive and Qualitive Molecular Detection for Plant and Animal Proteins Used in Processed Meat in Syrian Markets

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية

(علوم الأغذية)

إعداد المهندسة

بنان أحمد بشير الشيخ

المشرف العلمي

أ.د. عبد الحكيم عزيزية

كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق

قسم علوم الأغذية

المشرف المشارك

أ.د. عصام قاسم

كلية العلوم- جامعة دمشق

قسم العلوم الحيوانية

2024 م

ا

قُدّمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة– جامعة دمشق، وأُجزيت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the PHD Degree in Food Science, Faculty of Agriculture-Damascus University. The thesis has been approved by referee committee.

نُوقشت هذه الرسالة بتاريخ 22.9.2024

لجنة الحكم على الرسالة:

أ.د. عبد الحكيم عزيزية **(مشرفاً)**

أ.د. صباح يازجي **(عضواً)**

د. نزار عيسى **(عضواً)**

د. هدى حبال **(عضواً)**

د. رأفت إسماعيل **(عضواً)**

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة: " **الكشف الجزيئي النوعي والكمي عن البروتينات الحيوانية والنباتية الداخلة في اللحوم المصنعة في الأسواق السورية** " هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة بنان الشيخ بإشراف الأستاذ الدكتور عبد الحكيم عزيزية، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة بجامعة دمشق، والدكتور عصام قاسم، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق. وإن المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص.

المرشحة	المشرف العلمي	المشرف المشارك
بنان الشيخ	أ.د. عبد الحكيم عزيزية	أ.د. عصام قاسم

Certificate

It is hereby certified that, the work described in this thesis" ***Quantitive and Qualitive Molecular Detection for Plant and Animal Proteins Used in Processed Meat in Syrian Markets***" is the result of scientific research done by candidate Banan Alshaikh under the supervision of Prof. Abdul Hakim Azizieh, Food Science, Faculty of Agriculture, Damascus University, and Prof. Essam Kasem, Zoology Department, Faculty of Science, Damascus University. And any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate	**supervisor**	Co- supervisor
Banan Alshaikh	Pro. Abdul Hakim Azizieh	Pro. Essam Kasem

تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الرسالة تحت عنوان:

"**الكشف الجزيئي النوعي والكمي عن البروتينات الحيوانية والنباتية الداخلة في اللحوم المصنعة في الأسواق السورية**" لم يسبق أن قدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدّم حالياً لذلك، وأن كافة العمل والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرف العلمي والمشرف المشارك، وأن جميع المراجع التي ذكرت في الأطروحة نسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

المرشحة

بنان الشيخ

DECLARATION

To Whom It May Concern: I declare that the present research work entitled: "***Quantitive and Qualitive Molecular Detection for Plant and Animal Proteins Used in Processed Meat in Syrian Markets"*** is a new research work, and has neither been already accepted for any degree. All the mentioned results are my own efforts and done by direct supervision of my guides. All the referred literature is cited, and well-documented in the list of references.

Candidate

Banan Alshaikh

فهرس المحتويات

	الصفحة
شهادة	II
تصريح	**III**
فهرس المحتويات	**IV**
قائمة الجداول	**VII**
قائمة الأشكال	**VIII**
قائمة المصطلحات	**X**
الملخص	**XI**
المقدمة	**1**
مشكلة البحث	**3**
تساؤلات البحث	**3**
فرضيات البحث	**3**
مبررات البحث	**4**
أهداف البحث	**4**
1.الدراسة المرجعية	**5**
1.1. الطرائق المستخدمة لتحديد هوية أنواع اللحوم	**6**
1.1.1. الطرائق المعتمدة على البروتين	**6**
2.1.1. الطرائق المعتمدة على الدنا	**7**

1.2.1.1. أهم التقنيات المعتمدة على الـ PCR في كشف غش اللحوم	**8**
2.1. الطرائق المستخدمة للكشف عن بروتينات فول الصويا ومورثات التعديل الوراثي	**12**
3.1. الطرائق المستخدمة لتقدير كمية البروتين في الأغذية	**15**
2. مواد وطرائق البحث	**17**
1.2. المواد المستخدمة في البحث	**18**
1.1.2. العينات المدروسة	**18**
2.1.2. عينات فول الصويا المعدل وراثياً المرجعية	**20**
3.1.2. المواد	**20**
2.2. الطرائق	**21**
1.2.2. استخلاص الدنا DNA Extraction	**21**
1.1.2.2. استخلاص الدنا من عينات الدم	**21**
2.1.2.2. استخلاص الدنا من عينات اللحوم المدروسة	**22**
3.1.2.2. استخلاص الدنا من عينات فول الصويا المرجعية	**23**
4.1.2.2. التقدير النوعي للدنا DNA Qualification	**23**
5.1.2.2. تحضير هلامة الآغاروز	**24**
2.2.2. تضخيم الدنا DNA Amplification	**24**
1.2.2.2. تضخيم الدنا الميتوكوندري المعزول من العينات المدروسة	**24**
2.2.2.2. تضخيم مورثة اللكتين ومورثات التعديل الوراثي في العينات المدروسة	**25**
3.2.2. الهضم بأنزيمات القطع المحددة Restriction Enzymes Digest	**28**
1.3.2.2. تحضير هلامة متعدد الأكريل أميد	**29**

4.2.2. المعلوماتية الحيوية Bioinformatics	**30**
5.2.2. تحديد كمية البروتينات الكلية المنحلة باستخدام طريقة برادفورد	**30**
3.النتائج والمناقشة Results and Discussion	**31**
1.3. نتائج تحديد هوية أنواع اللحوم	**31**
1.1.3. نتائج استخلاص الدنا	**31**
2.1.3. نتائج تضخيم الدنا	**34**
3.1.3. نتائج الـ PCR-RFLP	**38**
2.3. نتائج الكشف عن فول الصويا والتعديل الوراثي	**55**
1.2.3. نتائج استخلاص الدنا	**55**
2.2.3. نتائج تضخيم الدنا	**55**
3.3. نتائج التحديد الكمي للبروتينات الكلية المنحلة	**60**
4.الاستنتاجات	**61**
5. المقترحات والتوصيات	**62**
6.المراجع	**64**
7. الملاحق	**79**
Abstract	**82**

قائمة الجداول

	الصفحة
الجدول (1): أطوال القطع الناتجة عن هضم أنزيمات قطع الدنا المحددة للدنا المضخم من المورثةmt12S rDNA في أنواع لحوم مختلفة (أنماط القطع للأنواع الحيوانية المرجعية).	**10**
الجدول (2): أنواع العينات المدروسة ومعلومات بطاقة البيان لكل منها.	**18**
الجدول (3) أهم المواد المستخدمة.	**20**
الجدول (4): مكونات تفاعل PCR لجزء من المورثة الميتوكوندرية mt12SrRNA.	**25**
الجدول (5): شروط الدورات الحرارية لتضخيم المورثة الميتوكوندرية mt12SrRNA.	**25**
الجدول (6): البادئات المناسبة للمورثات المدروسة والأوزان الجزيئية للحزم المتوقعة.	**26**
الجدول (7): مكونات تفاعل PCR لمورثة اللكتين ومورثات التعديل الوراثي.	**27**
الجدول (8): شروط الدورات الحرارية للبادئات المستخدمة.	**27**
الجدول (9): أنزيمات القطع المحددة المستخدمة وأماكن القطع الخاص بكل منها.	**28**
الجدول (10): مكونات تفاعل الـ PCR-RFLP والتعديلات المطبقة.	**29**
الجدول (11): أطوال القطع الناتجة عن هضم أنزيمات قطع الدنا المحددة للدنا المضخم من المورثة الميتوكوندرية mt12SrRNA في نوع الديك الرومي البري والديك الرومي ذو العيينات.	**40**
الجدول (12): طرز القطع الناجمة عن قطع إنزيمات القطع المحددة للدنا المضخمة لقطعة من المورثة الميتوكوندرية mt12SrRNA للعينات المدروسة.	**52**
الجدول (13): نتائج تحليل المواد المعدلة وراثياً في مصنعات اللحوم اعتماداً على Duplex PCR	**59**

قائمة الأشكال

	الصفحة
الشكل (1) رحلان الدنا الكلي المستخلص من عينات اللحوم المدروسة (B, C, D, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R) على هلامة الأغاروز 1%.	**33**
الشكل (2) رحلان الدنا الكلي المستخلص من عينات اللحوم المدروسة (A, E, F, S, T, U, V, W, X, Y) على هلامة الأغاروز 1%.	**34**
الشكل (3): رحلان ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA لعينات دم نوع الديك الرومي البري (M.g) والديك الرومي ذو العيينات (M.o)، والعينات (E, F, V, W, X, Y) في هلامة آغاروز 2%.	**36**
الشكل (4): رحلان ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA للعينات (B, C, D, G, H, I, J, K, L, M, N, O, R, S) في هلامة آغاروز 2%.	**37**
الشكل (5): رحلان ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA للعينات (A, P, Q, S, T, U) في هلامة آغاروز 2%.	**37**
الشكل (6) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات نوع الديك الرومي البري *(Meleagris gallopavo)* والديك الرومي ذو العيينات (*Meleagris ocellata*) في هلامة عديد الأكريلاميد.	**39**
الشكل (7): مقارنة سلسلتي المورثة عند الديك الرومي البري والديك الرومي ذو العيينات والاختلاف في موقع قطع الانزيم *BspTI*.	**41**
الشكل (8) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات البسطرمة(A)، الروستو (B، C) والسلامي (D) في هلامة عديد الأكريلاميد.	**43**

الشكل (9) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة للعينة E في هلامة عديد الأكريلاميد.	44
الشكل (10) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات النقانق (F)، اللانشون (G، I، R)، في هلامة عديد الأكريلاميد.	46
الشكل (11) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات اللانشون (S، U) والهوت دوغ (M) في هلامة عديد الأكريلاميد.	47
الشكل (12) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات الكباب (V، W) والشقف (X، Y) في هلامة عديد الأكريلاميد.	48
الشكل (13) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة للعينة H في هلامة عديد الأكريلاميد.	49
الشكل (14) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة للعينات J، K و L في هلامة عديد الأكريلاميد.	51
الشكل (15): رحلان ناتج تضخيم Duplex PCR لعينات اللحوم المصنعة المدروسة في هلامة آغاروز 2%.	57
الشكل (16): رحلان ناتج تضخيم PCR مورثة التعديل الوراثي NOS لعينات اللحوم المصنعة المدروسة في هلامة آغاروز 2%.	58
الشكل رقم (17): تركيز البروتينات الكلية المنحلة في الخلاصات البروتينية للعينات المدروسة وعينات عدة لحوم مرجعية وعينات نباتية.	61

قائمة المصطلحات

المصطلح	الاختصار
Barcode of Life Data	BOLD
Base pair	bp
Bovine Serum Albumin	BSA
Cauliflower Mosaic Virus	CaMVi
Certified Reference Materials	CRM
Threshold Cycle	Ct
Cytochrom b	Cyt b
Dioxyribo nuclear Acid	DNA
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate	EPSP
European Reference Materials	ERM
Genetically Modified Organism	GMO
Mitochondrial 12S ribosomal ribonucleic acid	mt12SrRNA
Mitochondrial 16S ribosomal ribonucleic acid	mt16S rRNA
Mitochondrial DNA	mtDNA
Nuclear DANN	nDNA
Nopalin Synthase terminator	NOS Terminator
Phosphate Buffer Saline	PBS
Polymerase Chain Reaction	PCR
Restriction fragment length polymorphisim	RFLP
Polyvinyl Polypyrrolidone	PVPP
Real-Time PCR	RT-PCR
Ribonuclear acid	RNA
Roundup Ready Soybean	RRS
Tris Boric-EDTA	TBE
Tris-EDTA	TE
World Health Organisation	WHO

الملخص

هدف البحث الى تحديد هوية اللحوم الداخلة في خلطات منتجات اللحوم المصنعة الموجودة في السوق السورية المحلية، للتحقق من مصداقية بطاقة البيان الخاصة بها من خلال تطبيق تقنية هضم ناتج تضخيم الدنا بأنزيمات قطع محددة (PCR-RFLP)، وكذلك الكشف عن فول الصويا والتحري عن وجود المواد المعدلة وراثياً فيها من خلال استثمار تقنيات الـ PCR.

جمعت خمس وعشرون عينة من منتجات اللحوم المصنعة ولحوم معاملة حرارياً بشكل عشوائي، (بسطرمة، روستو، سلامي، نقانق، لانشون، هوت دوغ، كباب وشقف) في عام 2018. نفّذ البحث في مخابر الهيئة العامة التقانة الحيوية ومخابر كلية الهندسة الزراعية.

تم تحديد نوع اللحوم الداخلة في العينات المدروسة من خلال تضخيم دنا جزء من المورثة الميتوكوندرية mt12SrDNA باستخدام بادئ عام، عوملت منتجات التضخيم بخمسة أنزيمات قطع من النمط الثاني *ApoI*، *AluI*، *HhaI*، *MspI* و*BspTI* وقورنت أنماط القطع الخاصة بالعينات مع أنماط القطع الخاصة بعينات مرجعية كشاهد ايجابي. تم الكشف عن وجود فول الصويا في منتجات اللحوم من خلال تضخيم مورثة اللكتين المميزة لفول الصويا. تم تحديد فيما إذا كان فول الصويا في العينات الإيجابية معدل وراثياً أم لا، من خلال استهداف سلاسل تنظيمية خاصة بمورثات التعديل الوراثي (35S promoter, NOS terminator)، ومن ثم التحري عن المورثة المعدلة وراثياً لمقاومة المبيدات والموجودة في فول الصويا المعدل وراثياً من النوع Roundup Ready Soybean (RR) من خلال تضخيم الـ CaMVi35S promoter. تم أيضاً تقدير نسبة البروتينات الكلية المنحلة.

أظهرت النتائج أن سبعة عشر عينة كانت مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها، بينما كانت ثمان عينات غير مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها من حيث نوع اللحوم الداخلة في تصنيعها. كما أظهرت النتائج أن أحد عشر عينة كانت إيجابية لمورثة اللكتين ومتوافقة مع بطاقة البيان وأربع عينات كانت سلبية لمورثة اللكتين وغير متوافقة

مع بطاقة البيان. كما أن عشر عينات كانت تحوي مواد معدلة وراثياً، ثلاث عينات منها تحوي فول الصويا من النوع RR. تراوحت كمية البروتينات الكلية المنحلة في معظم العينات بين (1–1.3 ملغ/غ)، مما يعني أن هذه العينات تحوي نسب جيدة من اللحوم و/أو البروتينات النباتية. بينما تراوحت في ثلاث عينات بين (0.2–0.9 ملغ/غ) مما يعني أن هذه العينات تحوي الحد الأدنى من اللحوم والبروتينات النباتية.

تعد تقنية PCR-RLFP رخيصة نسبياً ودقيقة وهي حساسة وسريعة مما يؤهلها كتقنية هامة وعملية لتحديد هوية ومنشأ أنواع اللحوم. كما أن استهداف مورثة اللكتين والـ CaMVi35S promoter معاً بطريقة الـ Duplex PCR قادرة بكفاءة على الكشف عن فول الصويا المعدل وراثياً لمقاومة المبيدات مما يوفر الوقت والتكلفة.

الكلمات المفتاحية: منتجات اللحوم المصنعة، بطاقة البيان، PCR-RFLP، فول الصويا، المواد المعدلة وراثياً، Duplex PCR ،البروتين.

المقدمة Introduction:

تعد اللحوم ومنتجاتها جزءاً مهماً من النظام الغذائي للإنسان لأنها تحتوي على البروتينات والأحماض الأمينية الأساسية بالإضافة إلى المعادن والفيتامينات الضرورية للنمو. تسعى شركات صناعة الغذاء لتحقيق متطلبات المستهلك بمنتجات مرغوبة، إذ تمتلك صناعة اللحوم حصة كبيرة على مستوى العالم من بين المنتجات الغذائية في تأمين الغذاء، وإن الطلب المتزايد على منتجات اللحوم المصنعة جعلها في طليعة القضايا الهامة المتعلقة بجودة الغذاء. وعلى الرغم من وجود قوانين وطنية ودولية مختلفة للإشراف على جودة وسلامة اللحوم ومنتجاتها، إلا أن غش اللحوم لا يزال منتشراً على مستوى العالم.

إن ممارسات غش اللحوم لا تخرق قواعد السوق وإنما تنتهك أيضاً الأعراف الأخلاقية والتشريعات الدينية وتخاطر بسلامة الغذاء وتهدد الصحة العامة، فقد تسبب بعض المكونات الداخلة في خلطات تصنيع اللحوم ردود فعل تحسسية لبعض الأشخاص. يتضمن الغش في اللحوم ومصنعاتها، استخدام أنواع لحوم ذات قيمة تجارية منخفضة، استبدال البروتينات الحيوانية ببروتينات نباتية، وضع بطاقات بيان غير صحيحة أو مضللة.

تستخدم بروتينات فول الصويا على نطاق واسع في منتجات اللحوم وخاصة المنتجات المستحلبة نظراً لخصائصها الوظيفية الفريدة التي تساعد على تحسين العمليات التكنولوجية المستخدمة في تصنيع منتجات اللحوم وتقليل تكاليفها كالقدرة على ربط الماء وربط الدهون والاستحلاب والميزات الحسية كالمظهر والصلابة والملمس وخصائص التقطيع. وفي المقابل، يعد فول الصويا واحداً من المواد الغذائية المسببة للحساسية عند بعض الأشخاص. يمثل فول الصويا المعدل وراثياً لمقاومة مبيدات الأعشاب Roundup Ready Soybean (RR) العنصر الأساسي في مكونات العديد من الأغذية ومنتجات اللحوم إذ أنه الصنف الوحيد المعتمد للسوق في الاتحاد الأوروبي. هناك جدل دائم حول سلامة الكائنات المعدلة وراثياً في جميع أنحاء العالم، ويعد الكشف عن المواد المعدلة وراثياً في الأغذية أمراً مهماً للبلدان التي لديها قوانين إلزامية لوضع العلامات الخاصة

بالكائنات المعدلة وراثياً، إذ يتراوح الحد المسموح به من المواد المعدلة وراثياً من 0.9 وحتى 5% في دول الاتحاد الأوروبي والبرازيل وروسيا واليابان. إن حماية المستهلكين من الممارسات السيئة لغش اللحوم ومن منتجات لحوم تحمل بطاقات بيان مضللِة أو خاطئة، أو وجود مواد معدلة وراثياً غير معلن عنها في بطاقة بيان المنتَج، تعد دائماً من القضايا المهمة التي تحث السلطات القانونية والباحثين على تطوير تقانات مختلفة لكشف الغش وضمان جودة المنتجات.

تم في هذا البحث تمييز أنواع اللحوم المختلفة الداخلة في عينات مختلفة من منتجات لحوم موجودة في الأسواق السورية، والتحري عن فول الصويا المعدل وراثياً، وكذلك تقدير كمية البروتينات الكلية المنحلة لتقدير القيمة الغذائية والاقتصادية في هذه المنتجات، وقد تناولت الدراسة كل من الفصول الآتية:

الفصل الأول يتضمن الدراسات المرجعية المتعلقة بالطرائق المتبعة لتحديد هوية اللحوم والمواد المعدلة وراثياً، وتقدير كمية البروتينات في هذه المنتجات.

الفصل الثاني: ذُكرت فيه مواد البحث وطرائقه من حيث مكان تنفيذ البحث والعينات المدروسة وطريقة تحضير المواد اللازمة للاختبارات المطلوبة وكذلك الطرائق المتبعة لتنفيذ هذه الاختبارات.

الفصل الثالث يبين النتائج التي تم الحصول عليها لأنواع اللحوم والبروتينات النباتية الداخلة في خلطات التصنيع ومدى تطابق العينات المدروسة مع بطاقة البيان الخاصة بكل منها، وكذلك نتائج وجود المواد المعدلة وراثياً وتحديد نوع التعديل الوراثي، وتقدير كمية البروتينات في العينات المدرسة ومناقشة هذه النتائج.

الفصل الرابع: يوضح أهم الاستنتاجات التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة من حيث مزايا وعيوب الطريقة المتبعة لتحديد هوية أنواع اللحوم والكشف عن فول الصويا المعدل وراثياً.

الفصل الخامس: ذكرت فيه أهم التوصيات التي تركز على ضرورة الاستفادة من نتائج هذه الدراسة في التطبيقات العملية.

الفصل السادس: يحتوي المراجع التي استخدمت في هذا البحث.

مشكلة البحث

تصنع معظم منتجات اللحوم من لحوم مطحونة لا يمكن التعرف عليها بسهولة في هذه المنتجات، ونتيجة لذلك فإن منتجات اللحوم المصنعة أكثر عرضة للتسميات الخاطئة فيما يتعلق بمحتوى الأنواع الحيوانية والبروتينات النباتية وغيرها من الإضافات، إضافة لعدم توفر طرائق مخبرية معتمدة ودقيقة لكشف الغش في هذه المنتجات. لذلك يعد التحقق من مصداقية أنواع اللحوم المعروضة في السوق المحلية في مدينة دمشق، مسألة تثير القلق المتزايد وخاصة في ظل ظروف عولمة إنتاج الغذاء وتجارته.

تساؤلات البحث

- هل بطاقة بيان اللحوم المصنعة والمعاملة حرارياً واضحة ودقيقة وتلبي معايير الجودة ومتطلبات المستهلك؟
- هل البروتينات النباتية المستخدمة في مصنعات اللحوم في السوق المحلية معدلة وراثياً؟
- هل يمكن اقتراح تعديل المواصفة القياسية السورية الخاصة بمصنعات اللحوم باستخدام التقنيات المعتمدة على الـ PCR للتعرف على أنواع اللحوم الداخلة في خلطات اللحوم المصنعة محلية الصنع والمستوردة؟

فرضيات البحث

إمكانية خلط اللحوم المصنعة ببروتينات حيوانية ونباتية غير مصرّح عنها في بطاقة البيان، والتي لايمكن الكشف عنها باستخدام الطرائق التقليدية لكشف وتقدير البروتين. كذلك إمكانية استخدام طرائق الـ PCR والتقنيات المشتقة منه في التعرف على أنواع البروتينات المضافة والتعديل الوراثي.

لذلك في هذا البحث كان لابد من تسليط الضوء على هذا النوع من الفرضيات للتأكد من مصداقية المعلومات الموضوعة في بطاقة البيان.

مبررات البحث

- اقتصار المواصفة القياسية السورية الخاصة بمصنعات اللحوم على تحديد نسبة البروتين العام على ألّا تقل عن 10.5% دون الاشارة الى: مصدر البروتين، نسبة البروتين النباتي الى الحيواني، نوع البروتين النباتي المضاف، وجود بروتينات نباتية معدلة وراثياً.
- ضرورة تفعيل قانون الأمان الحيوي رقم 24 عام 2012 والذي يهدف إلى وضع إطار تنظيمي للبحث والتطوير في مجال الهندسة الوراثية، من خلال توطين التقانات اللازمة لكشف المواد المعدلة وراثيا.
- عدم وجود دراسات محلية سابقة تستخدم التقانات الجزيئية للتأكد من مصداقية بطاقة البيان لمصنعات اللحوم بدقة.

أهداف البحث

1) تحديد نوع البروتين الحيواني والنباتي الداخل في مصنعات اللحوم المحلية والمستوردة.
2) تحديد نوعية البروتين النباتي المضاف بالطرائق الجزيئية.
3) التحري عن وجود بروتين الصويا المعدل وراثيا الداخل في مصنعات اللحوم.

1. الدراسة المرجعية Literature Review

تعد اللحوم نظام غذائي متوازن، تحتوي على 20٪ الى 35٪ بروتين، وتوفر جميع الأحماض الأمينية الأساسية، التي يحتاجها الجسم بمعدل يكفي لسد حاجة جسم الإنسان للنمو والترميم والتطور، عكس البروتينات النباتية الموجودة في الحبوب والبقوليات، والتي تحتوي على بروتينات ينقصها واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية الأساسية. وتشمل الأحماض الأمينية الأساسية: الأيزولوسين واللوسين واللايسين والميثيونين والفينيل آلانين والتريونين والتربتوفان والفالين والهستيدين. بالإضافة إلى أنها مصدر جيد للمعادن كالحديد، الصوديوم، البوتاسيوم، المغنزيوم، النحاس والزنك. واللحوم أيضاً غنية بفيتامينات B وفقيرة بالفيتامينات الأخرى، ومن فيتامينات B الموجودة في اللحوم بكميات مناسبة: الثيامين والريبوفلافين والنياسين وحمض البانتونيك والبيوتين وحمض الفوليك والبيروكسيدين. ولا تشكل اللحوم مصدراً للكربوهيدرات إلا إذا أضيفت لها أثناء عملية تصنيع المنتجات على هيئة سكر أو نشاء (Doosti *et al*., 2014; Cascella *et al*., 2018; Zheng *et al*., 2019).

يعد اللانشون والسجق والنقانق وغيرها، من منتجات اللحوم المصنعة الرئيسية واسعة الانتشار في العالم، وهي من أكثر الأطعمة تفضيلاً واستهلاكاً بسبب قيمتها الغذائية العالية وطعمها اللذيذ والمحبب لدى شريحة واسعة من المستهلكين، ويمكن استهلاكها مباشرة دون إعداد إضافي في البيوت. كما تتميز مصنعات اللحوم بأنها تصلح لجميع الوجبات والأوقات، وخاصة في الوقت الحالي بسبب قلة الوقت اللازم لعمليات التحضير والطبخ المنزلي، ويمكن أن تحفظ لفترات قصيرة (عدة أيام) أو طويلة (عدة أشهر) حسب نوعها مما يعطيها إمكانية التسويق لمسافات بعيدة (عزيزية، 1995).

تصنع معظم منتجات اللحوم باستخدام لحوم مطحونة لا يمكن التعرّف على نوعها بسهولة، وبالتالي فإنّ التحقق من مصداقية أنواع اللحوم مسألة تثير القلق المتزايد وخاصة في ظل ظروف عولمة إنتاج الغذاء وتجارته، إذ تلعب احتياجات المستهلك الصحية أو المتطلبات الاقتصادية أو التفضيلات الدينية دوراً في تحديد الأنواع الحيوانية، والاضافات المختلفة الداخلة في منتجات اللحوم (Kumar *et al*., 2014; He *et al*., 2018;

Sreenivasan and Viljoen, 2021). تتطلب لائحة وضع بطاقات البيان، أن تكون مكونات منتجات اللحوم مذكورة بوضوح على العبوة لحمايةالمستهلك من الغش(Doosti *et al.*, 2014; Abuzinadah *et al.*, 2015)

تنص المواصفة القياسية السورية رقم 80 تاريخ 2011 الخاصة باللحم المفروم والناعم والمحفوظ والمعلب (لحم لانشون) – التعديل الثاني: أن يحضر المنتج من اللحم المفروم المعالج الخالي من العظم والناتج من لحم البقر و/أو الضأني أو الماعز أو الجمال والمفروم فرماً ناعماً والمملح والذي يمكن أن يكون قد دُخّن سابقاً. ويمكن أن يدخل فيه الأحشاء الصالحة للأكل عدا دهن ومشتقات الخنزير كما يمكن إضافة لحوم الدواجن في تحضيره. كما يسمح باستخدام مكونات اختيارية نذكر منها: سكريات وبروتينات تستعمل كمواد رابطة (بطاطا، قمح، خبز، حليب مجفف، بروتين البيض، بروتينات نباتية، زبدة). على ألا تقل نسبة اللحم في المنتج النهائي عن 80% حد أدنى المكافئ لنسبة بروتين تعادل 10.5 % حد أدنى وألا تتجاوز نسبة الدهن فيها 25 % حد أقصى الذي يكافئ لنسبة بروتين تعادل 10.5 % حد أدنى.

1. 1. الطرائق المستخدمة لتحديد هوية أنواع اللحوم:

1.1.1. الطرائق المعتمدة على البروتين:

تتكون اللحوم بشكل أساسي من البروتينات، وتمتاز بروتينات معينة بتركيب وبنية ثلاثية الأبعاد مميِّزة للأنواع، مما يسمح بالكشف عن غش اللحوم باستخدام الطرائق المعتمدة على البروتين. تضم طرائق الكشف عن غش اللحوم المعتمدة على البروتين االطرائق الثلاثة التالية: (1) التحليل الكهربي استناداً إلى خصائص حزم البروتين، ولكن حساسية هذه الطرق غير كافية. (2) المقايسات المناعية القائمة على التفاعلات الخاصة بالأجسام المضادة للمستضد (ELISA)، والتي اكتسبت شعبية كبيرة في تجارة الأغذية على أساس البساطة والتكلفة المنخفضة وهي أكثر موثوقية لتحديد الأنواع الحيوانية. (3) التحليل الطيفي الكتلي القائم على البروتينات أو البيبتيدات القصيرة. ومع ذلك، فإن تمسخ البروتين في ظل المعاملة الحرارية الشديدة يقلل من دقة الكشف عن اللحوم أثناء معاملة الأغذية، ويجعل مثل هذه التقنيات غير مناسبة لتحديد أنواع اللحوم خاصة في منتجات اللحوم المصنعة (Li *et al.*, 2020).

2.1.1. الطرائق المعتمدة على الدنا:

الحمض النووي هو المادة الرئيسية لتخزين المعلومات الوراثية ونسخها ونقلها، ويوجد في جميع أنسجة الحيوانات ويكون أكثر ثباتاً من البروتينات (Kumar *et al*., 2015; Xiang *et al*., 2017). على الرغم من أن الاختلاف في محتوى الحمض النووي في أنسجة اللحوم وأنواعها يمكن أن يؤثر على تقدير كمية اللحوم، فإن PCR والتقنيات المشتقة منه المعتمدة على الحمض النووي هي أكثر التقنيات شيوعاً في اكتشاف غش اللحوم ومنتجاتها بسبب حساسيتها وبساطتها.

تمتلك جزيئات الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين (DNA)، على عكس البروتينات والببتيدات، مزيداً من الثبات ضد المعاملات الحرارية والكيميائية القاسية. وبالتالي، فإن الطرائق المعتمدة على الحمض النووي أكثر ملائمة للكشف عن أنواع اللحوم في عينات اللحوم المختلفة (Asensio *et al*., 2008; Zhao *et al*., 2019; Mansouri *et al*., 2020; Khairil *et al*., 2020).

يوجد في الخلية الحية نوعين من الدنا التي يمكن استهدافها في اختبارات تحديد هوية الأنواع، هما الدنا النووية (nDNA)، الدنا الميتوكوندرية (mtDNA)، يتم استهداف مورثات الحمض النووي الميتوكوندري بشكل تفضيلي لأنه يمتلك العديد من المزايا مقارنة مع مورثات الدنا النووي (Hassab El-Nabi *et al*., 2021) فهو موجود في نسخ متعددة في الخلايا مما يزيد من احتمال اكتشاف تسلسل معين. بالإضافة إلى ذلك فإن الحمض النووي الميتوكوندري أكثر مقاومة للتفكك بسبب شكله الحلقي، إذ تزيد هذه الميزة من فرصة تضخيم مناطق الحمض النووي غير التالفة، كما أنه مرتباً بشكل أكثر كفاءة (Bottero and Dalmasso, 2011). تعد طرائق تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR) طرائقاً معروفةً جيداً قائمة على الحمض النووي للكشف عن الأصل الحيواني في المواد الغذائية (Yang *et al*., 2022). من أهم المورثات التي يتم استهدافها لتحديد أنواع اللحوم هي: مورثات Cyt b، 12S rRNA، 16S rRNA-D loop، الوحدة الفرعية ATPase 6 وATPase 8، dehydrogenases NADH ووحدات أوكسيديز

السيتوكروم COI، COII و COIII ولذلك فهي أهداف شائعة لتصميم برايمرات خاصة لتفاعل الـ PCR المحدد للنوع (species-specific PCR) و الـ PCR المتعدد(Multiplex PCR) .

1.2.1.1. أهم التقنيات المعتمدة على الـ PCR في كشف غش اللحوم:

- تفاعل PCR المحدد للنوع (Species-specific PCR) :

تتميز طريقة تفاعل البوليميراز التسلسلي المحدد للنوع بالحساسية والدقة العالية والنوعية، لذا فهي تستخدم بشكل شائع في التحقق من مصداقية اللحوم وتتبع المنشأ (Bhat *et al.*, 2016; Ha *et al.*, 2017). من جهة أخرى، لا يمكن لهذه الطريقة من تحديد هوية أكثر من نوع واحد ومحدد من اللحوم في المنتجات تبعاً للبادئ المستخدم (Kumar *et al.*, 2015)، وبالتالي فإنها غير فعالة في حالة الكشف عن عدة أنواع من اللحوم في نفس المنتج وتستغرق وقتاً طويلاً وجهداً أكبر (Shabani *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019).

- تفاعل الـ PCR المتعدد(Multiplex PCR):

تعد خصوصية البادئات شرطاً أساسياً لاختبارات الـ PCR المتعدد إذ يجب أن تتطابق البادئات المستخدمة مع تسلسلات دنا محددة في الأنواع المستهدفة دون غيرها (Murugaiah *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2015)، ووفقاً لذلك تعد نوعية البادئات أمراً بالغ الأهمية للتحقق من أنواع اللحوم، إذ يجب أن تملك درجة انصهار مماثلة أو قريبة تضمن ارتباط قوي بين المورثات المستهدفة والبادئات بنفس شروط تفاعل الـ PCR (Wu *et al.*,2009).

طُوّر تفاعل الـ PCR المتعدد بحيث يتم التفاعل مع عدة أزواج من البادئات الخاصة بالأنواع بشكل كبير لأنها توفر اكتشاف عدة مورثات في تفاعل واحد (Ali *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2015). صمم Ali وآخرون (2015) خمسة أزواج من البادئات الخاصة بالأنواع التي تستهدف مورثات الدنا الميتوكوندري (ND5، مورثة ATPase 6، و Cyt b) لاكتشاف لحوم القطط

والكلاب والخنازير والقرود والفئران في وقت واحد. تم أيضاً تصميم مرئسات لأنواع اللحوم الأخرى، مثل الدجاج، الغنم، النعام، الحصان، الجرذان، الجاموس، أنواع الثعالب وغيرها (Hossain *et al*., 2016; Wang *et al*., 2019; Qin *et al*., 2019). أشار الباحثون Li وآخرون، إلى أن زيادة عدد البادئات المستخدمة في تفاعل الـ PCR يؤدي غالباً الى انخفاض كفاءة التضخيم أو حتى فشله (Li *et al*., 2019)

- تقنية قطع ناتج تضخيم الدنا بأنزيمات القطع المحددة Polymerase Chain Reaction Restraction Fragment Length Polymorphisim (PCR-RFLP):

يتم في طريقة الـ (PCR- RFLP) تضخيم منطقة محددة ومصانة (conserved regions) من سلسلة الدنا باستخدام الـ PCR ثم يتبع ذلك قطع ناتج التضخيم بإنزيمات القطع (restriction enzymes) والتي توضح الاختلافات الوراثية بين الأنواع (Partis *et al*, 2000). وهي طريقة حساسة ودقيقة ومتعددة الاستخدامات للتحقق من مصداقية أنواع اللحوم (Rashid *et al*., 2015; Hsieh and Hwang, 2004)، وهي أكثر بساطة وتوفيراً للوقت من الـ PCR بالوقت الحقيقي (Ali *et al*., 2018). استخدم Doosti وزملاؤه (2014) تقنية PCR-RFLP للتعرف بنجاح على لحوم نوعي الحصان والحمار في الأطعمة الحلال. بالإضافة إلى البقر والجاموس والغنم والماعز (Girish *et al*., 2005)، والبقر والأيك والجاموس (Chen *et al*, 2010)، والخنزير والخنزير البري (Mutalib *et al*., 2012)، وتم أيضاً تمييز لحوم الدجاج والبقر والغنم بنجاح باستخدام تقنية الـ PCR-RFLP (Kušec *et al*., 2017)، وتم بنجاح تمييز 14 نوع حيواني: غنم، ماعز، بقر، جاموس، جمل، خنزير، حصان، حمار، كلب، قطة، أرنب، جرذ، فأر، دجاج، عن طريق تضخيم جزء من المورثة الميتوكوندرية 12SrRNA وباستخدام خمسة أنزيمات قطع (Alshaikh *et al*., 2015). إلا أنه لا يمكن استخدام هذه التقنية في تحديد نسب خلط اللحوم كمياً (Hossain *et al*., 2017).

يوضح الجدول (1) أنماط القطع المميزة للأنواع الحيوانية المرجعية حسب النتائج الموضحة في دراسة كل من (Girish *et al*, 2004; Alshaikh *et al*, 2015)

الجدول (1): أطوال القطع الناتجة عن هضم أنزيمات قطع الدنا المحددة للدنا المضخم من المورثةmt12S rDNA في أنواع لحوم مختلفة (أنماط القطع للأنواع الحيوانية المرجعية):

نوع اللحم	رقم البئر	1	2	3	4	5
	أنزيم القطع المحدد	*ApoI*	*AluI*	*HhaI*	*MspI*	*BspTI*
غنم (*Ovis aries*)		365+130[1]	250+200	-[2]	400+90	-
ماعز (*Capra hircus*)		-	250+215	-	400+90	360+135
بقر (*Bos taurus*)		-	400+95	-	-	-
جمل (*Camelus dromedarius*)		-	240+150+90	-	-	-
جاموس (*Bubalus bubalis*)		-	-	250+225	420+90	-
خنزير (*Sus barbatus*)		-	300+170	-	-	-
حصان (*Equus caballus*)		-	375+60+50	-	365+125	-
حمار (*Equus asinus*)		-	375+60+50	-	-	-
أرنب (*Oryctolagus cuniculus*)		-	215+155+100	-	-	-
كلب (*Canis lupus familiaris*)		-	325+90	-	-	-
قطة (*felis catus*)		400+80	200+125+90	-	-	-
جرذ (*Rattus norvegicus*)		-	340+75+50	-	-	-
فأر (*Mus musculus*)		460+50	375+75	-	-	-
دجاج (*Gallus gallus*)		-	250+170+50	-	-	-

(1): تشير إلى طول العصابة مقدرة بـ زوج أساس (bp).

(2): تشير (-) إلى عدم حدوث هضم للدنا المضخمة من خلال أنزيم القطع المحدد

- تقانة الـ PCR بالوقت الحقيقي Real- Time PCR (RT-PCR):

يتم تنفيذ تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي من خلال مراقبة إشارة التألق للدنا، مما يسمح بتقدير الكمية الأولية للمورثات المستهدفة دون خطوات إضافية (Xu *et al*., 2018). تستخدم تقنية الـ RT-PCR: أصبغة الـ SYBR Green ومسابر الـ TaqMan بشكل شائع في الدراسات الكمية. يمكن اكتشاف نوع واحد من اللحوم فقط باستخدام SYBR Green، بينما تتميز تقنية الـ RT-PCR باستخدام TaqMan بخصوصية وحساسية أعلى من SYBR Green والأهم من ذلك، يمكن استخدامها لاكتشاف الأنواع المتعددة ولكن تكلفتها أعلى بكثير (Xu *et al*., 2018). أظهر تفاعل البوليميراز التسلسلي في الوقت الحقيقي نوعية أعلى وحساسية أكبر ومجالاً للأتمتة، مقارنة مع تفاعل البوليميراز التسلسلي المباشر، ويمكن أن يخفف بشكل كبير التلوث الاعتراضي الممكن حدوثه عند إجراء تفاعل البوليميراز التسلسلي (Al-kahtani, Ismail and Ahmad, 2017). يمكن إجراء التحليل الكمي بواسطة الـ PCR في الوقت الحقيقي من خلال دراسة العلاقة الخطية بين كمية الحمض النووي وقيمة الدورة العَتبيّة (Threshold Cycle (Ct)) (Kumar *et al*., 2015; Fang and Zhang, 2016). تم تطبيق تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي لتحديد لحوم أنواع الخنزير والبقر والديك الرومي والدجاج والغنم بكميات أقل من 0.1٪، حتى في منتجات اللحوم المعاملة حرارياً (Kumar *et al*., 2015).

- سَلْسَلة الدنا DNA Sequencing:

تتطلب عمليات الكشف عن غش اللحوم، تحديد العديد من أنواع اللحوم غير المعروفة، وهذا لا يمكن الوصول اليه من خلال استخدام التقنيات السابقة، لذلك طُوّرت تقنية تشفير الحمض النووي (Hebert *et al*., 2003; Cavin *et al*., 2018) من خلال إجراء تضخيم وتسلسل لمورثات معينة، ثم البحث عنها في نظام تشفير البيانات الحياتية Barcode of Life Data (BOLD) وقاعدة بيانات

المركز الوطني الأمريكي لبيانات التكنولوجيا الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI)، وبالتالي يمكن تحديد الأنواع غير المعروفة (Fiorino *et al.*, 2018). اعتمدت تقنية تشفير الحمض النووي بشكل أساسي على تسلسل سانجر Sanger للدنا لما يقرب من 650bp لمورثات الاوكسيديز COI والسيتوكروم ب Cty b في الأنواع الحيوانية (Böhme *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2020).

1. 2. الطرائق المستخدمة للكشف عن بروتينات فول الصويا ومورثات التعديل الوراثي:

تُضاف البروتينات النباتية إلى منتجات اللحوم مثل اللانشون والنقانق والسجق والهمبرغر، لتخفيض تكاليف الإنتاج، ويعد بروتين الصويا الأكثر استخداماً في منتجات اللحوم إذ تُحسّن إضافة فول الصويا إلى خلطات تصنيع منتجات اللحوم من امتصاص الماء، ويوفّر مستحلباً أفضل. لهذا السبب، فإنّ منتجي مصنعات اللحوم حريصون على استخدامه في تحضير مثل هذه المنتجات (Belloqu *et al.*, 2002; Janssen, Voortman and De baaij, 1987). تتم إضافة فول الصويا على شكل مسحوق ذو تركيز بروتيني مرتفع إلى خلطات مصنعات اللحوم، ويعد ذلك في العديد من البلدان أمراً محظوراً واحتيالياً. وعند استخدامه بنسب كبيرة يشعر المستهلك بطعم غير محبب في الفم، ولتغطية هذا الطعم يتم استخدام كمية كبيرة من الدهون الحيوانية وغيرها من المضافات. من ناحية أخرى، يعد بروتين الصويا من الأطعمة المسببة للحساسية، إذ يعاني ما يقرب من 8٪ من الأطفال و 2٪ من البالغين حساسية تجاه أنواع معينة من الأغذية (Jansem *et al.*, 1994).

في عام 1999، قررت هيئة الدستور الغذائي إلى ضرورة الإشارة إلى جميع الأغذية التي تحتوي على مواد مسببة للحساسية وهي خمس مواد غذائية (بيض، حليب، قمح، فول سوداني، حنطة سوداء) ثم توسع عددها لاحقاً ليشمل أكثر من عشرين مادة غذائية؛ وذلك بوضع علامات واضحة على الأغذية حتى لا يستخدمها المستهلكون الذين يعانون من الحساسية تجاهها (Zarkadas *et al.*, 1999; Fujimura *et al*, 2008). وفي بعض البلدان، يعد وجود أو عدم وجود الصويا في الأغذية أمراً مهماً، ولكن في البعض الآخر، تعد كمية فول

الصويا المضافة الأمر الأهم. تُستخدم طرائق مختلفة لتحديد فول الصويا في منتجات اللحوم، كالفحص المجهري، والطرائق الكيميائية المناعية، والطرائق المناعية، وطرائق الرحلان الكهربائي. لكن، لم تكن أيّ من هذه الطرائق مرضية تماماً لأنها لم تكن قادرة على الكشف عن فول الصويا في معظم منتجات اللحوم (Fekri *et al*., 2020). كما يمكن أيضاً استخدام الطرائق المعتمدة على الدنا (طرائق الـ PCR) للكشف عن فول الصويا في منتجات اللحوم وذلك من خلال الكشف عن مورثة اللكتين المميزة له (Meyer et al., 1996; Taski-Ajdukovic *et al*., 2009; Elsanhoty, 2013).

إنّ إضافة البروتين النباتي ليست مهمة في حد ذاتها، ولكن إضافة البروتينات النباتية مع غياب أي بيانات عنها. وخاصة عندما تكون من المواد المسببة للحساسية الكامنة لدى بعض الأشخاص، أو عندما تكون هذه البروتينات معدلة وراثياً، يمكن أن يؤدي إلى تغييرات في رغبات المستهلكين والإضرار بصحتهم (Aksoy and Sönmezoglu, 2022).

وفقاً لتعريف منظمة الصحة العالمية World Health Organisation(WHO)، يتم تعريف المواد المعدلة وراثياًGenetecally Modified Organisims(GMO) بأنها تعديل غير طبيعي على الحمض النووي (Aksoy and Sönmezoglu, 2022). نظراً للتقدم الكبير في التقانات الحيوية أصبح العلماء قادرين على استخدام الهندسة الوراثية بنجاح في التعديل الوراثي للنباتات. تُظهر المواد المعدلة وراثياً خصائص جديرة بالاهتمام مثل مقاومة الحشرات وتحمّل مبيدات الأعشاب ومقاومة الإجهاد البيئي والتعديلات في محتوى الأغذية من بعض المواد (Ashrafi-Dehkordi *et al*, 2021; Tahmasebi *et al*., 2019). وقد تم تسجيل العديد من أصناف النباتات المعدلة وراثياً في جميع أنحاء العالم وأكثرها انتشاراً فول الصويا والذرة والكانولا والقطن، والتي تعد بدورها المحاصيل التجارية الرئيسية المزروعة والمعدلة وراثياً. تتضح أهمية فهم ضرورة الكشف عن المواد المعدلة وراثياً، عند معرفة أنه يتم استخدام الصويا في 900 نوع من الأغذية والذرة في 700 نوع منها (Sönmezoglu and Keskin, 2015).

تشير التقديرات إلى أن 81٪ من المحاصيل المعدلة وراثياً، هي أصناف تتحمّل مبيدات الأعشاب الغليفوسات مثل المنتج التجاري Roundup Ready (RR) (Bonny, 2011). على الرغم من تحديات زيادة

أعداد النباتات الزراعية (الأعشاب) المقاومة لمبيدات أعشاب الغليفوسات، فإنّ الأصناف التي تتحمّل الغليفوسات مثل فول الصويا RR، والذرة RR، والكانولا RR، والقطن RR لا تزال هي الأصناف النباتية المعدلة وراثياً الأكثر شيوعاً والمزروعة على نطاقٍ واسع (Benbrook, 2012; Cuhra, 2015).

يتم إنشاء أصناف جديدة من النباتات المعدلة وراثياً كل عام، على الرغم من كل المخاوف المتعلقة بالتأثيرات غير المدروسة بشكل كاف والتي تسببها المواد المعدلة وراثياً (GMO) على صحة الإنسان والبيئة (Kumar *et al*., 2020). تتم مناقشة القضايا المتعلقة بسلامة المنتجات المعدلة وراثياً والتحكم في تطبيقها في جميع أنحاء العالم (Yang and Chen, 2016; Slot *et al*., 2018). إنّ الحد الأدنى لوضع علامات على المنتجات الغذائية المعدلة وراثياً في اليابان يصل إلى 5%؛ وفي استراليا ونيوزيلندا 1%؛ وفي دول الاتحاد الأوروبي 0.9% (Milavec *et al*., 2014; Borges *et al*., 2018). وفي سوريا، يهدف قانون الأمان الحيوي رقم 24 عام 2012 إلى وضع إطار تنظيمي للبحث والتطوير في مجال الهندسة الوراثية. ولذلك فإنه من الضروري توطين التقانات اللازمة لكشف المواد المعدلة وراثياً.

تم إحراز تقدم كبير في تطوير طرائق التحليل الجيني للكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً في عينات الأغذية والأعلاف (Rott *et al*., 2004; Fraiture *et al*., 2015). تستخدم الطرائق التحليلية القائمة على تقنية الـ PCR بشكل متزايد لاكتشاف تسلسل الحمض النووي المستهدف بشكل متزايد في الكائنات المعدلة وراثياً نظراً لتعدد استخداماتها وحساسيتها وخصوصيتها وتطبيقاتها الإنتاجية العالية (Gryson *et al*., 2004; Morisset *et al*., 2009; Gürakan *et al*., 2011).

يسمح تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR) بالتضخيم الانتقائي لمناطق معينة من سلاسل الحمض النووي في خليط من سلاسل الحمض النووي الأخرى. وغالباً ما يستخدم تفاعل البلمرة للكشف عن التسلسلات التنظيمية المشتقة من بلازميد الأكروباكتيريوم مثل Nopalin Synthase terminator (NOS t)، وعن التسلسلات المشتقة من فيروس فسيفساء القرنبيط Caulifower Mosaic Virus الـ CaMVi35S promoter، كأداة للكشف عن الجينات المستهدفة في الكائنات المعدلة وراثياً (Lipp *et al*., 2001; Holden

et al., 2010). وبما أن CaMVi35S promoter هو أحد أكثر العناصر المستخدمة في التعديل الوراثي، فقد تم استخدامه في العديد من الأبحاث (Wu *et al*., 2014).

يعتمد الكشف عن وجود المواد المعدلة وراثياً على خصوصية وحساسية تفاعل الـ PCR، طريقة عزل الحمض النووي، وكمية ونوعية الحمض النووي الذي تم الحصول عليه. تؤثر طرائق أخذ العينات، حجم العينة، ونوع المادة الغذائية في اكتشاف الكائنات المعدلة وراثياً في كفاءة استخلاص الحمض النووي من عينات الأغذية والأعلاف (Aksoy and Sönmezoglu, 2022).

3.1. الطرائق المستخدمة لتقدير كمية البروتين في الأغذية:

يعد التحديد الصحيح لمحتوى البروتين في الأغذية أمراً مهماً لأنه يحدد القيمة الاقتصادية للمنتَج الغذائي (Hayes, 2020). وتشترط المواصفة القياسية السورية رقم 80 تاريخ 2011 الخاصة بمصنعات اللحوم ألّا تقل نسبة البروتين العام عن 10.5%. توجد العديد من الطرائق المستخدمة في الصناعات الغذائية المختلفة لتحديد محتوى البروتين في الأغذية، وتشمل هذه الطرائق: كيلداهل (Kjeldahl)، دوماس (Dumas)، وطرائق القياس باستخدام التحليل الطيفي بما في ذلك، طريقة بيوريت (Biuret) وبرادفورد (Bradford) ولوري (Lowry) وطرائق تحديد محتوى الأحماض الأمينية الكلية. ولكل طريقة محاسنها ومساوئها (Hayes, 2020).

تتضمن طريقة كلداهل تقييم محتوى العينة من النتروجين، عن طريق هضم المادة بحمض قوي (حمض الكبريت المركّز) يحيث يتم تحرير النيتروجين، لتتم معايرته لاحقاً. يتم حساب كمية البروتين الخام من خلال ضرب تركيز البروتين الخام في العينة بقيمة معامل التحويل (6.25)، نظراً لأن معظم بروتينات اللحوم تحتوي عادةً على 16% نيتروجين. تعد هذه الطريقة القياسية الأكثر استخداماً لقياس البروتين، ولكن لايمكنها قياس البروتين الحقيقي نظراً لاحتواء بعض المواد غير البروتينية على النيتروجين، كما أنّ قيمة معامل التحويل غير مناسبة لجميع أنواع البروتينات، ويجب تصحيحها بناءً على محتوى الأحماض الأمينية للبروتين المعني. إنّ طريقة كيلداهل تبالغ في تقدير محتوى البروتين الحقيقي، كما أنها شاقة وتستغرق وقتاً طويلاً، ومكلفة، ومن المحتمل أن تكون خطرة على المخبري بسبب طبيعة المواد المستخدمة فيها. يتم التعبير عن محتوى البروتين

كغرام لكل 100 غرام من العينة الجافة (Montegiove *et al*, 2021).

يعتمد مبدأ طريقة دوماس على تحويل النيتروجين الموجود في العينة إلى أكاسيد النيتروجين الغازية، عن طريق الاحتراق الكامل في فرن عند درجة 950 – 1100 درجة مئوية. يتم بعد ذلك إرجاع المنتج النهائي (NOx) إلى N_2، وقياسه باستخدام كاشف التوصيل الحراري. إن طريقة دوماس سريعة ولا تستخدم المواد الكيميائية، ولكنها مكلفة في الإعداد وليست دقيقة جداً، لأنها لا تقيس البروتين الحقيقي أيضاً (Montegiove *et al*, 2021).

تعد طرائق القياس الطيفي، بما في ذلك طرائق Biuret وBradford وLowry، سريعة وسهلة الاستخدام وليست مكلفة ويمكنها كشف كميات صغيرة من البروتين. ومع ذلك، يمكنهم إعطاء نتائج خاطئة اعتماداً على طريقة تحضير العينة المستخدمة وقابلية ذوبان عينة الاختبار (Hayes, 2020).

يعتمد مبدأ طريقة برادفورد على ارتباط جزيء صبغة أزرق الكوماسي، Coomassie Brilliant Blue G250، بالبروتينات مما يؤدي إلى تغير لون المعقد من البني إلى الأزرق، حيث يتغير طيف امتصاص الصبغة من 465 نانومتر إلى 595 نانومتر (Bradford, 1976).

يتضمن تحليل الأحماض الأمينية المباشر، الحلمهة الحمضية للبروتين باستخدام HCL والتقدير الكمي اللاحق للأحماض الأمينية باستخدام HPLC (Hayes, 2020).

2. مواد وطرائق البحث Materials & Methods:

نُفّذ البحث في مخابر كلية الزراعة، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية – قسم الحيويات الطبية.

وقد نُفذ البحث بإجراء الخطوات التالية:

1) جمع عينات دم من نوع الديك الومي البري ونوع الديك الرومي ذو العيينات، وكذلك جمع عينات لحوم مصنعة، محلية الصنع ومستوردة، (مرتديلا، نقانق، هوت دوغ، بسطرمة، سلامي، روستو) من السوق المحلية.
2) استخلاص الدنا الكلي للبروتينات النباتية والحيوانية على حد سواء باستخدام طاقم عزل الدنا المناسب.
3) تضخيم الدنا الحيواني باستخدام بادئ (primer) عام تستهدف جزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12SrRNA ومن ثم تحديد أنواع اللحوم الداخلة في خلطات مصنعات اللحوم باستخدام تقنية الـ PCR-RFLP.
4) تضخيم الدنا النباتي باستخدام بادئ نوعي يستهدف مورثة اللكتين للكشف عن فول الصويا.
5) الكشف عن التعديل الوراثي من خلال استهداف سلاسل تنظيمية خاصة بمورثات التعديل الوراثي (35S promoter, NOS termenator).
6) التحري عن مورثة مقاومة النبات للمبيدات من خلال تضخيم الـ CaMVi35S promoter للمورثة المسؤولة عن اصطناع أنزيم 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP)الموجودة في فول الصويا المعدل وراثياً من النمط Roundup Ready Soybean (RR).
7) تحديد كمية البروتينات الكلية المنحلة في العينات المدروسة بطريقة برادفورد (1979).

1.2. المواد المستخدمة في البحث:

1.1.2. العينات المدروسة:

جُمعت عينات دم لكل من نوع الديك الرومي البري (*Meleagris gallopavo*) ونوع الديك الرومي ذو العيينات (*Meleagris ocellata*) بعد التأكد من النوع الحيواني (عينات مرجعية)، بواسطة عبوة معقمة مفرغة من الهواء ووضعت في أنبوب جمع دم يحتوي على مادة مميعة للدم (K_3EDTA)، ثم وزعت إلى أنابيب ابندورف معقمة 1.5 مل بمقدار 500 ميكروليتر دم في كل أنبوب، وحفظت العينات عند درجة الحرارة -20°م لحين الاستخدام.

جُمعت أيضاً 25 عينة من منتجات اللحوم المصنعة وعينات لحوم معاملة حرارياً (بسطرمة، روستو، سلامي، نقانق، لانشون، هوت دوغ، قطع لحم مشوي، كباب)، بعضها مزود ببطاقة بيان وبعضها الآخر غير مزود بها، وبشكل عشوائي من الأسواق المحلية في دمشق، وبثلاث مكررات لكل عينة. رُمزت العينات بحرف من الأحرف الأبجدية للتعرف عليها كما يوضح الجدول (2).

الجدول (2): أنواع العينات المدروسة ومعلومات بطاقة البيان لكل منها.

رمز العينة	نوع العينة	المصدر	معلومات بطاقة البيان
A	بسطرمة	محلي	لحم بقري، طحين القمح، توابل، خالية من لحم الخنزير ومشتقاته.
B	روستو	محلي	لحم هبرة بقري، توابل، المنتج مع مواد رابطة، خالية من لحم الخنزير ومشتقاته.
C	روستو	مستورد	لحم بقر، نشاء، بروتين الصويا، بهارات.
D	سلامي	محلي	لحم بقري، بروتين نباتي، خالية من لحم الخنزير ومشتقاته.
E	نقانق طازجة	محلي	بدون بطاقة بيان (لحم بقر حسب معلومات البائع).
F	نقانق طازجة	محلي	بدون بطاقة بيان (لحم دجاج حسب معلومات البائع).

G	لانشون	مستورد	لحم دجاج 80%، نشاء القمح، توابل، بروتين الذرة المهدرج.
H	لانشون	مستورد	لحم 81% (بقر، حبش، دجاج)، نشاء البطاطا، دقيق الخردل، توابل.
I	لانشون	مستورد	دجاج 80%، نشاء البطاطا، بهارات.
J	لانشون	مستورد	لحم 80%(بقرودجاج)، نشاءبطاطا، بروتين صويا مركز، طحين ماستردا، بهارات
K	لانشون	مستورد	لحم 80% (70% بقر، 10% دواجن)، نشاء البطاطا، بروتين الصويا، بهارات، نسبة الدهن لاتقل عن 10%، نسبة البروتين 12%.
L	هوت دوغ	مستورد	70% لحم بقر و10% لحم دواجن، 10% دهن، نشاء، بروتين الصويا، 11% بروتين.
M	هوت دوغ	مستورد	80% لحم دجاج، نشاء البطاطا، بروتين الحليب، محلول بروتين نباتي، بهارات.
N	لانشون	مستورد	لحم دجاج، بروتين نباتي، نشاء، توابل.
O	لانشون	محلي	لحم دجاج، نشاء، بروتين نباتي، توابل.
P	لانشون	محلي	لحم بقر ودجاج، بروتين الصويا، بهارات.
Q	لانشون	محلي	لحم بقر ودجاج، بروتين الصويا، كمية لحم الدجاج أكبر من كمية لحم البقر، خالية من لحم الخنزير ومشتقاته.
R	لانشون	محلي	لحم دجاج مسحوب العظم آلياً، نشاء، بروتين الصويا، توابل، خالي من لحم الخنزير ومشتقاته.
S	لانشون	محلي	لحم دجاج منزوع العظم آلياً، بروتين الصويا، بهارات، بروتين الصويا.
T	لانشون	محلي	لحم بقري ولحم دجاج، نشاء، بروتين الصويا، توابل.
U	لانشون	محلي	لحم دجاج، نشاء، توابل، بروتين نباتي.
V	كباب	محلي	بدون بطاقة بيان (لحم دجاج حسب معلومات البائع)

W	كباب	محلي	بدون بطاقة بيان (لحم ديك حبش حسب معلومات البائع)
X	شقف	محلي	بدون بطاقة بيان (لحم دجاج حسب معلومات البائع)
Y	شقف	محلي	بدون بطاقة بيان (لحم ديك حبش حسب معلومات البائع)

2.1.2. عينات فول الصويا المعدل وراثياً المرجعية:

أُستخدم مسحوق فول الصويا كمادة مرجعية معتمدة Certified Reference Materials (CRM) من المواد المرجعية الأوروبية European Reference Materials (ERM) وهي عبارة عن مسحوق فول الصويا المعدل وراثياً من النوع Roundup Ready Soybean بنسبة 10% كشاهد إيجابي (ERM-BF410 gn) ونسبة 0% كشاهد سلبي (ERM-BF410 ak) (Elsanhoty, 2013).

3.1.2. المواد:

يوضح الجدول (3) أهم المواد والمحاليل الموقية المستخدمة في هذه الدراسة:

الجدول (3) أهم المواد المستخدمة:

اسم المادة	الشركة المصنعة
المحلول الموقي ACE: ((0.8g NH_4Cl, 0.01g KH_2PO_4, 540µl 0.5M EDTA\ 100 ml (pH:6.8-7.2))	(usb, USA)
المحلول الموقي Phosphate Buffer Saline (PBS): (140mM NaCl, 50mM KCl, 1.6mM KH_2PO_4, 15mM $Na_2HPO_4.H_2O$ (pH:7.2))	(usb, USA)
المحلول الموقي Tris Boric EDTA (TBE) 1X: (90mM Tris, 90mM Boric Acid, 2mM EDTA (pH:8))	(usb, USA)
بروتيناز K	(Segma, USA)
طاقم استخلاص الدنا (QIAamp Blood MiniKit)	(Qiagen, Germany)
طاقم استخلاص الدنا من أنسجة النبات (Wizard Genomic DNA Purification Kit)	(Promega, USA)

آيزوبروبانول	(Panreac, E.U)
ايتانول مطلق	(Panreac, E.U)
آغاروز	(Panreac, E.U)
سائل التحميل Loading buffer	(Fermentase, Canada)
50 bp DNA Ladder	(Fermentase, Canada)
100 bp DNA Ladder	(Fermentase, Canada)
Master mix	(Genedirex, USA)
بادئ عام Universal primers لتضخيم جزء من المورثة mt 12S Rdna	(DNA alpha, Canada)
بادئ متخصص (GM03/GM04) لتضخيم مورثة اللكتين	(Eurofins genomics, Germany)
بادئات متخصصة لتضخيم التسلسلات التنظيمية الخاصة بمورثات التعديل الوراثي	(Eurofins genomics, Germany)
أنزيمات قطع محددة *ApoI, AluI, , HhaI, MspI, Bspt.*	(Fermentase, Canada)
هلامة متعدد الأكريل أميد Polyacrylamide gel بتركيز 8%: 13.3ml أكريل أميد بتركيز 30% (29g acrylamide + 1g bisacrylamide)، 10 ml من المحلول الواقي 5X TBE (pH8.3) ، 26.3 ml ماء مقطر ، 35 µl من TEMED ، 350 µl من Ammonium per sulfate 10% (APS)	(usb, USA)
محلول استخلاص البروتينات	(usb, USA)
ألبومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin)	(Segma, USA)

2.2. الطرائق:

1.2.2. استخلاص الدنا DNA Extraction:

1.1.2.2. استخلاص الدنا من عينات الدم:

أُستخلص الدنا من عينات الدم (لنوعيّ الديك الرومي) باستخدام طاقم خاص لاستخلاص الدنا (QIAamp Blood MiniKit) وداخل الخيمة العقيمة، وذلك بإتباع الإجراء المعد لاستخلاص الدنا من خلايا الدم مع تقليل

كمية الدم لـ 50 µl بدلاً من 200 µl كما هو موضح في الملحق رقم (1). وذلك بعد إجراء خطوات غسل عينة الدم وفق التالي:

أُخذ 50 µl من عينة الدم الطازج ووضعت في أنبوب ابندورف معقم (في حالة عينات دم مجمدة يتم وضع الأنبوب الحاوي على عينة الدم المجمد في حمام جاف بدرجة حرارة 37˚م لمدة خمس دقائق حتى انحلال الكريات الحمراء)، ثم جُنّست العينة بالتقليب اللطيف، ومن ثم ثُقلت لمدة دقيقة واحدة بسرعة 12000 دورة/دقيقة لترسيب كريات الدم الحاوية على المادة الوراثية. تم التخلص من الطافي في عبوة خاصة بالإتلاف تحتوي محلول هيبوكلوريد لمنع التلوث، وجُفف الأنبوب على ورق نشاف. أُضيف 1 مل من المحلول الموقي ACE المعقم بمرشحات خاصة، والحالّ لكريات الدم الحمراء إلى الراسب في الأنبوب وخُلط لمدة عشر دقائق بالتقليب اللطيف، ثم ثُقّل لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 12000 دورة/دقيقة، ومن ثم التخلص من الطافي في العبوة الخاصة بالإتلاف، وجُفف الأنبوب على ورق نشاف. أُضيف 1 مل من الـ ACE المحلول الموقي وأُجريت الخطوات اللاحقة لذلك عدة مرات حتى الحصول على رسابة خلايا نظيفة. أُضيف 1 مل من المحلول الموقي PBS المعقم بالاوتوغلاف إلى الرسابة وخُلط بالتقليب اللطيف للتخلص من آثار ACE، ثم ثُقّل لمدة دقيقة واحدة بسرعة 12000 دورة/دقيقة، وطُرح الطافي في العبوة الخاصة بالإتلاف.

2.1.2.2. استخلاص الدنا من عينات اللحوم المدروسة:

أُستخلص الدنا من العينات المدروسة باستخدام طاقم خاص لاستخلاص الدنا (QIAamp Blood MiniKit) وداخل الخيمة العقيمة. بإتباع الإجراء المعد لاستخلاص الدنا من الأنسجة مع اعتماد بعض التعديلات: زيادة تركيز بروتيناز K حتى 6 µg/µl، وتمديد فترة الحضن بحيث أصبحت طوال الليل، ومضاعفة كمية المحلول الموقي AL (AL Buffer) المستعملة (Alshaikh *et al.*, 2015) كما هو موضح في الملحق رقم (2).

3.1.2.2. استخلاص الدنا من عينات فول الصويا المرجعية:

أُستخلص الدنا من المواد المرجعية (CRM) باستخدام طاقم خاص لاستخلاص الدنا من أنسجة النبات (Wizard Genomic DNA Purification Kit) وداخل الخيمة العقيمة. بإتباع الإجراء المعد لاستخلاص الدنا من الأنسجة النباتية. كما هو موضح في الملحق رقم (3).

4.1.2.2. التقدير النوعي للدنا DNA Qualification:

تم التقدير النوعي للدنا (قِيَم الدنا) تبعاً لعدة معايير:

1. تقدير نقاوة الدنا: تم تقدير نقاوة الدنا بواسطة جهاز المطياف الضوئي في مجال الأشعة فوق البنفسجية UV-Spectrophotometer، أخذت القراءات عند طول الموجتين 260 نانومتر (nm) و280 نانومتر (nm) حيث تسمح النسبة بين القراءتين (الامتصاص عند طولي الموجتين 260/280 نانومتر) بتقدير نقاوة الدنا والتي يجب أن تكون مابين 1.8 إلى 2 للدنا النقي (Sambrook *et al.*, 1989).
2. التقدير الكمي للدنا: تسمح قراءة الامتصاصية عند طول الموجة 260 نانومتر بحساب تركيز الدنا في العينة، والذي يجب أن يكون تركيزه (50 - 100 ng/µl) للدنا النقي.

تم حساب تركيز الدنا من خلال المعادلة التالية:(Sambrook *et al.*, 1989)

DNA concentration (µg/ml)= OD_{260} X عامل التمديد X 50µg/ml

3. تقدير نوعية للدنا: يجب ألّا يقل الوزن الجزيئي للدنا المعزول والجيد عن (Kilo base) kb 5، تم التحقق من ذلك بترحيل الدنا بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز Agarose gel 1%، وتلوينه باستخدام مادة الايثيدوم بروماید التي ترتبط مع الدنا لتشكل معقد يتألق لدى تعرضه للأشعة فوق البنفسجية. إذ يجب أن يظهر بشكل عصابة محددة، ويشير ظهور مشح على طول البئر، إلى تكسّر الدنا (Sambrook *et al.*, 1989).

5.1.2.2. تحضير هلامة الآغاروز:

تُحضر هلامة الآغاروز بتركيز 1% بإضافة 1 غ آغاروز إلى 100 مل محلول موقي 0.5X TBE. وبعد تسخين المزيج السابق على حمام مائي مع التحريك المستمر حتى تمام الانحلال ثم التبريد إلى درجة الحرارة 65° م، يصب المزيج في القالب بعد تجهيزه وموازنته ثم يوضع المشط ويترك ليتهلم، وبعدها يزال المشط بحذر ويملأ حوض الرحلان بالمحلول الموقي 0.5X TBE، ولتحميل العينات على هلامة الآغاروز يخلط10 µl من الدنا المعزول مع 2µl من سائل التحميل Loading buffer وتوضع في الآبار المخصصة لها ضمن الهلامة، بالإضافة إلى تحميل سلمي الدنا مئوي الأساس 100 bp DNA Ladder (M1) وخمسيني الأساس 50 bp DNA Ladder (M2) وبعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي بتطبيق فرق الكمون 100 فولط توضع الهلامة في سائل التلوين (ماء مقطر مضاف إليه مادة ايثيديوم بروميد بتركيز 10^{-7}X5 ميكروغرام/مل) لمدة 45 دقيقة مع التحريك الهادئ، ثم تعرض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية UV- transilluminator عند طول موجة 320 nm، وتصور الهلامة لدراسة النتائج.

2.2.2. تضخيم الدنا DNA Amplification:

1.2.2.2. تضخيم الدنا الميتوكوندري المعزول من العينات المدروسة:

أُستخدم بادئ عام Universal primers (زوج من البادئات ترتبط بمنطقة محافظة لقطعة من دنا أنواع وسلالات مختلفة من الكائنات الحية) لتضخيم جزء من 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`

وفق الطريقة التي أوضحها (Kocher *et al.*, 1989) وإجراء التضخيم في أنابيب 0.2 ml (PCR tubes)، ضمن حجم تفاعل 50 µl، ويبين الجدول (4) مكونات تفاعل PCR.

واستخدم المدور الحراري من الطراز Mastercycler (Eppendorf, Germany) وفق شروط الدورات الحرارية الموضحة في الجدول (5) بعد ضبط درجة حرارة الغطاء على 105°م لمنع حدوث تبخر مكونات التفاعل وتجمعها على السطح الداخلي لغطاء أنبوب التفاعل (Girish *et al.*, 2004) .

الجدول (4): مكونات تفاعل PCR لجزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA.

حجم تفاعل واحد	تركيز المكونات
25 µl	1X Master mix
6 µl	8 µM primer mix (DNA alpha, Canada)
5-24 µl	500 ng DNA template
Up to 50 µl	PCR water (Roth, Germany)
50 µl	Final volume

الجدول (5): شروط الدورات الحرارية لتضخيم المورثة الميتوكوندرية mt12SrRNA:

المرحلة	درجة الحرارة °م	المدة	عدد الدورات الحرارية
تمسخ أولي	94°م	5 دقيقة	
تمسخ	94°م	45 ثانية	40
ارتباط	60°م	45 ثانية	
استطالة	72°م	1 دقيقة	
استطالة نهائية	72°م	10 دقيقة	

2.2.2.2. تضخيم مورثة اللكتين ومورثات التعديل الوراثي في العينات المدروسة:

تم استخدام بادئ متخصص (GM03/GM04) لتضخيم مورثة اللكتين Lectin (المميّزِة لفول الصويا House Keeping Gene)، في العينات المدروسة بما فيها عينات فول الصويا المرجعية المعتمدة وهما:

GM03 Primer: 5`-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C -3`

GM04 Primer: 5`-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG -3`

وفقاً لـ (Meyer *et al*, 1996) وكما ورد في الدراسات المرجعية (Taski-Ajdukovic *et al*., 2009; Elsanhoty, 2013). وتم أيضاً استخدام بادئات متخصصة لتضخيم التسلسلات التنظيمية الخاصة بمورثات التعديل الوراثي NOS terminator وCaMVi35S promoter الموجودة في المواد المعدلة وراثياً لمقاومة مبيدات الأعشاب (Roundup Ready)، للعينات المدروسة بما فيها عينات فول الصويا المرجعية المعتمدة. وفقاً لـ (Meric *et al*, 2014; Wurs *et al*, 1999) وكما ورد في الدراسات المرجعية Taski-Ajdukovic *et al*., 2009; Elsanhoty, 2013).

- NOS terminator:

tNOS2-5 Primer: 5`- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3`

tNOS2-3 Primer: 5`- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3`

- CaMVi35S promoter:

P35a-f2 Primer: 5`- TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G -3`

Petu-r1 Primer: 5`- TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T -3`

ويلخص الجدول (6) البادئات والمورثات المستهدفة وأطوال الحزم المتوقعة.

الجدول (6): البادئات المناسبة للمورثات المدروسة والأوزان الجزيئية للحزم المتوقعة.

البادئ	المورثة المستهدفة	درجة حرارة انصهار البادئ Tm	طول الحزمة المتوقع (الوزن الجزيئي)	المرجع
GM03\GM04	Lectin	58°C	118 bp	(Meyer *et al*, 1996)
tNOS2-5\tNOS2-3	NOS terminator	56°C	151 bp	(Meric *et al*, 2014)
P35a-f2\ Petu-r1	CaMVi35Spromoter	58°C	172 bp	(Wurs *et al*, 1999)

تم إجراء التضخيم في أنابيب (pcr tubes) 0.2 ml، ضمن حجم تفاعل 25 ميكروليتر، ويبين الجدول (7) مكونات تفاعل PCR لمورثة اللكتين ومورثات التعديل الوراثي. وباستخدام المدور الحراري ووفق شروط الدورات الحرارية الموضحة في الجدول (8).

الجدول (7): مكونات تفاعل PCR لمورثة اللكتين ومورثات التعديل الوراثي:

تركيز المكونات	حجم تفاعل واحد
1X Master mix	12.5 µl
10 µM primer mix (Eurofins genomics, Germany)	3 µl
DNA template for samples 100 ng DNA for CRM samples	5 µl 1.25 µl
PCR water (Roth, Germany)	Up to 25 µl
Final volume	25 µl

الجدول (8): شروط الدورات الحرارية للبادئات المستخدمة:

المرحلة	درجة الحرارة °م	المدة	عدد الدورات الحرارية
تمسخ أولي	95°م	2 دقيقة	
تمسخ	95°م	25 ثانية	40
ارتباط	58 \56°م	30 ثانية	
استطالة	68°م	45 ثانية	
استطالة نهائية	68°م	10 دقيقة	

أُجري تفاعل PCR لكل عينة دنا معزول وبثلاثة مكررات.

رُحلت نواتج التضخيم PCR products على هلامة آغاروز 2% وصبغت بالايثيديوم بروماید.

3.2.2. الهضم بأنزيمات القطع المحددة Restriction Enzymes Digest:

أُعتمدت خمسة أنزيمات قطع محددة من النمط الثاني استناداً إلى المعطيات المشار إليها في المرجعين (Girish *et al.*, 2004; Alshaikh *et al.*, 2015) وهي: *ApoI, AluI, , HhaI, MspI, Bspt.* كما في الجدول (9). ويتيح حدوث القطع بأنزيم محدد أو عدم حدوثه وأطوال الشدف الناتجة عن القطع (نمط القطع الخاص بكل نوع) تحديد هوية كل من هذه اللحوم المذكورة (لحوم الأنواع الحيوانية المرجعية) كما هو موضح في الجدول (1) علماً أنه تم استخدام كل من سلمي الدنا مئوي الأساس(M1) وخمسيني الأساس (M2) المذكورة سابقاً لتحديد طول العصابات الناتجة بشكل تقريبي.

الجدول (9): أنزيمات القطع المحددة المستخدمة وأماكن القطع الخاص بكل منها.

رقم الأنزيم	اسم الأنزيم	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

عُوملت منتجات التضخيم الناتجة بالأنزيمات الخمسة وباستخدام محاليل موقية موصى بها من الشركة الصانعة، وبإجراء التعديلات وفقاً لـ(Alshaikh *et al.*, 2015) كما هو موضح في الجدول (10) وذلك ضمن أنابيب 0.2 مل عقيمة، حُضّنت في درجة الحرارة الموصى بها لكل أنزيم طوال الليل، تم اجراء تفاعل الهضم بأنزيمات القطع المحددة لناتج تضخيم الدنا لكل عينة بثلاثة مكررات. تم ترحيل منتجات الهضم في هلامة عديد أكريل أميد 8%.

الجدول (10): مكونات تفاعل الـ PCR-RFLP والتعديلات المطبقة:

المكونات	الحجم	الحجم المعدل
Restriction enzyme	**1-2 µl**	**1.5 µl**
Respective buffer (Fermentase, Canada)	**2 µl**	**3 µl**
PCR water (Roth, Germany)	**18 µl**	**5.5 µl**
PCR product	**10 µl**	**20 µl**
Final volume	**31-32 µl**	**30 µl**

1.3.2.2. تحضير هلامة متعدد الأكريل أميد Polyacrylamide Gel (29:1):

غُسل لوحي الزجاج الخاصين بجهاز الرحلان (أحدهما أطول من الآخر) بالماء المقطر ثم مُسح اللوحان بالإيتانول لتخفيف التوتر السطحي. وُضعت فواصل خاصة على جانبي لوحي الزجاج للسماح بتشكيل فراغ بينهما لإضافة الأكريل أميد، تُثبّت مع بعضها وتوضع بشكل عامودي على قاعدة خاصة بجهاز الترحيل.

يُصب مزيج متعدد الأكريل أميد Polyacrylamide gel بتركيز 8% في الفراغ الحاصل بين لوحي الزجاج بهدوء لمنع تشكل فقاعات هوائية، يوضع المشط وبعد تصلب الهلامة ينزع المشط وتغسل الآبار من بقايا الأكريل أميد غير المتهلم باستخدام المحلول الموقي 1X TBE. تُوضع الهلامة في جهاز الرحلان العمودي بحيث يكون لوح الزجاج الصغير نحو الداخل، ثم تُغمر الهلامة بالمحلول الواقي 1X TBE. يتم تحميل عينات الدنا المضخم في الآبار وذلك بإضافة 3 µl من الدنا المضخم إلى 2 من µl سائل التحميل 6X Loading buffer. أما بالنسبة لعينات الدنا المهضوم بأنزيمات القطع المحددة فيتم إضافة 7 µl إلى 2 µl من سائل التحميل. كذلك يتم إضافة 3 µl من كلا سلمي الدنا مئوي وخمسيني الأساس. يُضبط الجهاز على فرق الكمون 100 فولط لمدة ثلاث ساعات تقريباً. بعد نهاية الترحيل، تُفصل الزجاجتين عن بعضهما، ثم تنزع الهلامة وتوضع في محلول التلوين الحاوي على الإيثيديوم بروماید بتركيز 10^{-7}X5 ميكروغرام/ مل لمدة 15 دقيقة ومن ثم تصور الهلامة بوجود الأشعة فوق البنفسجية.

4.2.2. المعلوماتية الحيوية Bioinformatics:

يتم الاستفادة من المعلومات المتاحة في المواقع الالكترونية للمعلوماتية الحيوية بإجراء دراسة نظرية أولية لسلاسل المورثات الخاصة بالعضويات الحيوية. إذ يمكن من خلالها معرفة موضع المورثة المدروسة بالنسبة للجينوم الكامل وطولها وتسلسل النيوكلوتيدات الخاصة بها، كما يتم أيضاً مقارنة تسلسل مورثة لكائنين مختلفين وبالتالي معرفة مواقع اختلاف وتشابه الأسس بينهما مما يسهل معرفة أنزيمات القطع المناسبة، لأن هذه الأنزيمات تقطع وفقاً لتسلسل دنا نوعي خاص لكل منها، مما يسمح بتمييز تسلسل الأسس في مورثات الكائنات المختلفة.

5.2.2. تحديد كمية البروتينات الكلية المنحلة باستخدام طريقة برادفورد:

- تحضير محلول استخلاص البروتينات:

(Tris-HCl 50mM (pH: 7.4), NaCl 150mM)

وُضع المحلول في عبوة زجاجية نظيفة وعُقم بالاتوغلاف وحُفظ بالبراد، وعند الاستخدام أُخذ 10 مل من محلول استخلاص البروتينات وأُضيف إليه المواد التالية:

(0.01% Triton X-100, 1% PVPP, 5mM β-Marcapto Ethanol) (pH: 7.4) (usb, USA).

- تحضير محلول قياسي من ألبومين المصل البقري BSA وبتراكيز(0، 31.25، 62.5، 125، 250، 500 ,1000، 2000) ميكروغرام/مل.

طُحن 5 غرام من عينات اللحوم المرجعية والمصنعة وعينات فول الصويا بالآزوت السائل، ثم وُضعت 0.5 غرام عينة مطحونة في أنبوب نظيف ورُجّت جيداً مع 2 مل محلول استخلاص البروتينات. ثُقّل الأنبوب لمدة 20 دقيقة على سرعة 16000 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 4° م. أُخذ الطافي (الخلاصة البروتينية) لتحديد تركيز البروتينات الكلية المنحلة والاستخدامات اللاحقة (Martinez *et al*, 2000). أُضيف975 ميكروليتر من محلول برادفورد (1X) الى 25 ميكروليتر خلاصة بروتينية (لكل من العينات المدروسة وتراكيز المحلول القياسي

لألبومين المصل البقري) في كوفيت بلاستيكي وأُخذ القراءات باستخدام جهاز الطيف الضوئي عند طول موجة 595 نانومتر.

3.النتائج والمناقشة Results and Discussion:

3.1. نتائج تحديد هوية أنواع اللحوم:

1.1.3. نتائج استخلاص الدنا:

إن إتباع الإجراءات الخاصة بعزل الدنا من الدم لعينات نوعي الديك الرومي البري والديك الرومي ذو العيينات والموصى بها من الشركة الصانعة كانت كافية للحصول على قيم عزل جيدة للدنا على الرغم من تقليل كمية الدم المأخوذة للاستخلاص الى 50 ميكروليتر بدلاً من 1000 ميكروليتر، لأن كريات الدم الحمراء والبيضاء تكون منوّاة عند الطيور لتكون قادرة على الطيران وتحمل الاجهاد لفترات طويلة. تراوحت نقاوة الدنا المعزول بين (1.7 – 2) وكميته بين (40 - 60 µg /ml) وهي قيم جيدة وتقع ضمن الحدود المتوقعة.

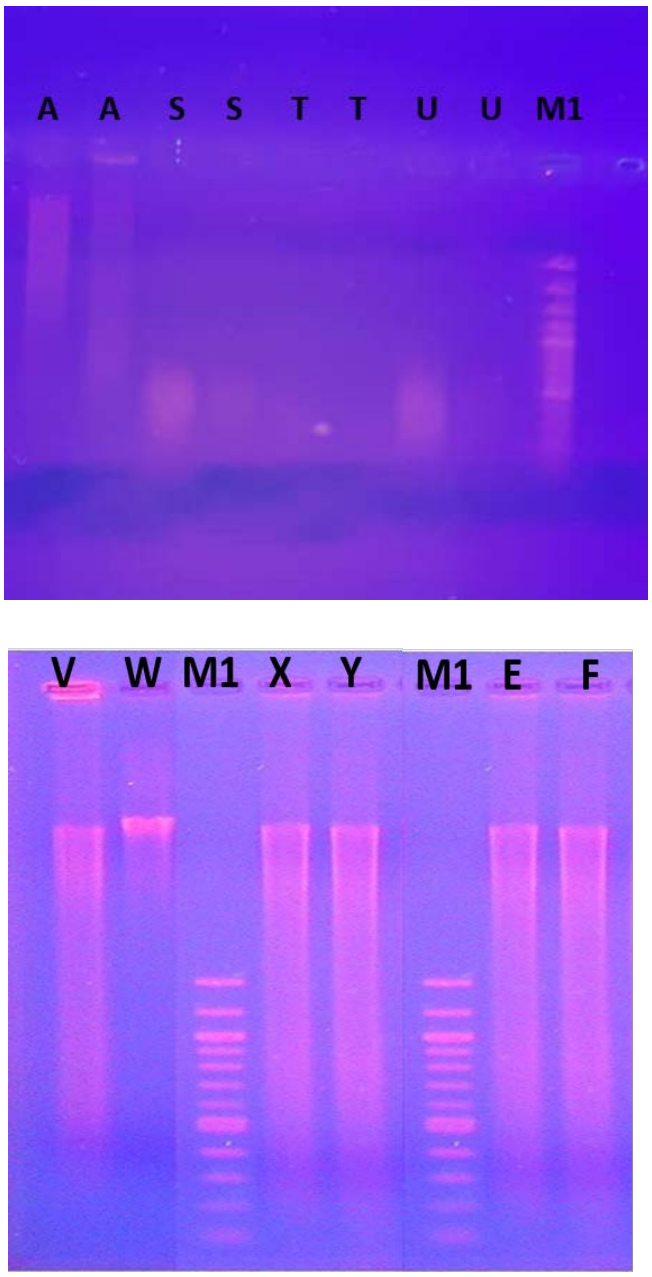
أخذت عينات اللحوم المعاملة حرارياً والمصنعة غير المعلّبة من أماكن مختلفة من العينة لضمان تمثيل كامل العينة بشكل حقيقي وبوزن موحّد (~50 ملغ) كما في عينات البسطرمة، الروستو، السلامي، النقانق، الكباب والشقف. بينما أخذت عينات اللانشون والهوت دوغ المعلّبة من مركز العبوة وذلك لضمان الحصول على دنا سليم قابل للتضخيم لاحقاً وإعطاء عصابات واضحة وذات كثافة عالية (Matsunga *et al.*, 1998; Alshaikh *et al*, 2015). إنّ إتباع الإجراءات الخاصة بعزل دنا الأنسجة والموصى بها من الشركة الصانعة مع إجراء التعديلات المذكورة سابقاً، أدى وبشكل عام إلى عزل دنا بنقاوة جيدة تراوحت بين (1.7 – 2) وبكمية متوقعة إذ تراوحت كمية الدنا المعزولة من عينات اللحوم المعاملة الحرارية والمصنعة غير المعلّبة بين (100- 300 µg/ml)، وتراوحت بين (30- 140 µg /ml) من عينات اللانشون والهوت دوغ (عينات معلبّة). ويعود السبب في ذلك إلى أن زيادة تركيز بروتيناز K وطول مدة الحضن عملتا على رفع كفاءة عمل الأنزيم في هضم البروتينات وتحرير الدنا ضمن وسط التفاعل، كما أن المعاملة الحرارية للعينات وأثر زيادة تركيز الأنزيم وطول

مدة الحضن تسهّل هضم البروتينات، وكذلك الأمر بالنسبة لتأثير زيادة كمية المحلول الموقي AL، فمن المحتمل أنه يلعب دوراً في عملية هضم وتفكيك البروتينات أيضاً كون الشركة الأم لم توضح تركيبه الكيميائي. كانت قيم عزل ونوعية الدنا في عينات الدم لنوعي الديك الرومي البري والديك الرومي ذو العيينات، عينات النقانق (E, F)، الكباب (V, W) والشقف (Y, X) الأفضل، إذ ظهر الدنا على شكل عصابة واضحة عند ترحيله على هلامة الآغاروز 1% مما يعني وجود دنا بحالة سليمة وكمية جيدة. تليها عينات البسطرمة (A)، الروستو (B, C)، السلامي (D) إذ كانت قيم عزل ونوعية الدنا أفضل نسبياً من عينات اللانشون والهوت دوغ، إذ ظهر على شكل مشح واضح وكثيف على طول البئر مما يعني وجود دنا متكسّر وبكمية مقبولة. لوحظ أيضاً وجود مشح ضعيف في بعض عينات اللانشون (U, S, Q, P, K, I) وعينة الهوت دوغ (L) مما يعني وجود الدنا بحالة تدهور شديد وكمية قليلة جداً أوحتى معدومة كما في عينات اللانشون (T,N). ويمكن تفسير ذلك إلى أنه عادة ما يتم استعادة اللحوم المستخدمة في إنتاج منتجات اللحوم ميكانيكياً عن طريق تقنيات الطحن والفرم والبثق وبعد ذلك يتعرض اللحم المستعاد ميكانيكياً لحرارة وضغط مرتفعين (116–118° م لمدة 60 دقيقة ،1.2 ضغط جوي) أثناء الطهي الصناعي وعملية التعليب ونتيجة لذلك تتأثر كمية ونوعية الحمض النووي في هذه المنتجات بشكل كبير. يوضح الشكل (1) والشكل (2) رحلان الدنا الكلي المستخلص من عينات اللحوم المدروسة على هلامة الآغاروز 1%.

توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسات السابقة والتي أشارت إلى أن سلامة الحمض النووي المستخرج من منتجات اللحوم المعاملة حرارياً والمصنعة تعتمد على نوع المعالجة الحرارية، إذ كانت اللحوم المعلبة معرّضة بدرجة أعلى لتدهور الحمض النووي وبالتالي فإنه من المتوقع أن تتناقص حصيلة الدنا المستخلص ويتكسر الحمض النووي المستخرج من عينات اللانشون والهوت دوغ بشكل عام مقارنة مع عينات البسطرمة، الروستو، السلامي، ويظهر على شكل مشح عند تصويره على هلام الآغاروز. بينما كانت حصيلة ونوعية الدنا أفضل في عينات الدم من نوعي الديك الرومي المدروسة، وعينات النقانق (E, F)، الكباب (V, W) والشقف (Y, X) إذ ظهر الدنا على شكل عصابة واضحة عند ترحيله على هلامة الآغاروز 1%

Matsunga *et al*, 1998; Andree *et al*., 2006; Salakar *et al*., 2012; Alshaikh *et al*., 2015;) تعد كفاءة استخلاص الحمض النووي .(Piskata *et al*., 2019; Sreenivasan and Viljoen, 2021 أمراً بالغ الأهمية لنجاح عملية التضخيم نظراً لوجود العديد من العوامل التي تمنع تضخيم الحمض النووي في المواد الغذائية ذات المعاملات المعقدة والقاسية كمصنعات اللحوم وتشمل المعالجات الحرارية القاسية والضغط المرتفع ومعالجة الأس الهيدروجيني مما يؤثر سلباً على لون ونكهة اللحوم لذلك يتم معالجة هذه المنتجات بمواد كيميائية وأنزيمية إضافية لتساعد في الحفاظ على نكهة وقوام ولون اللحوم والتي بدورها قد تؤثر سلباً أيضاً على كفاءة استخلاص الدنا واكتشاف الكائنات المعدلة وراثياً (Hubner, Studer and Luthy, 1999; Moriuchi *et al*., 2007; Anklam *et al*., 2002; Schnidler *et al*., 2010; Xia *et al*, 2019; Du, Chen & (Zhang, 2020

الشكل (1) رحلان الدنا الكلي المستخلص من عينات اللحوم المدروسة (B, C, D, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R) على هلامة الأغاروز 1%. تمثل الآبار M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس.



الشكل (2) رحلان الدنا الكلي المستخلص من عينات اللحوم المدروسة (A, E, F, S, T, U, V, W, X, Y) على هلامة الأغاروز 1%. تمثل الآبار M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس.

2.1.3. نتائج تضخيم الدنا:

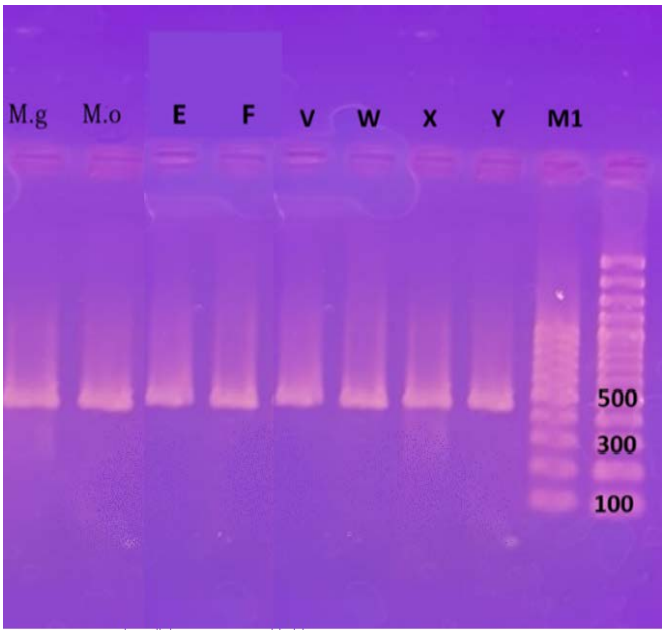
تحوي سلسلة الدنا الميتوكوندري على مناطق محافظة (conserved region) في العديد من الحيوانات لترتبطا بمنطقتين محافظتين وتضخما المنطقة الفاصلة والمتنوعة من تلك المورثة لدى الأنواع المتعددة من الحيوانات (Kocher *et al.*, 1989; Parakash *et al.*, 2000).

يضخم زوج البادئات المستخدمة في هذه الدراسة جزء من المورثة الميتوكوندرية mt 12S rDNA في جميع أنواع لحوم الثدييات لتعطي العصابة ذات الطول التقريبيbp480 المقاربة لما نشر في المراجع (Girish *et al*., 2004; Cahyadi *et al*., 2018; Galal-Khallaf, 2021; Islam *et al*., 2021). وفي نوع الدجاج كان طول العصابة التقريبي bp500 بما يتوافق مع المرجع (Alshaikh *et al*., 2015) وكذلك الأمر في نوعي الديك الرومي البري والديك الرومي ذو العيينات (عينات الدم المرجعية).

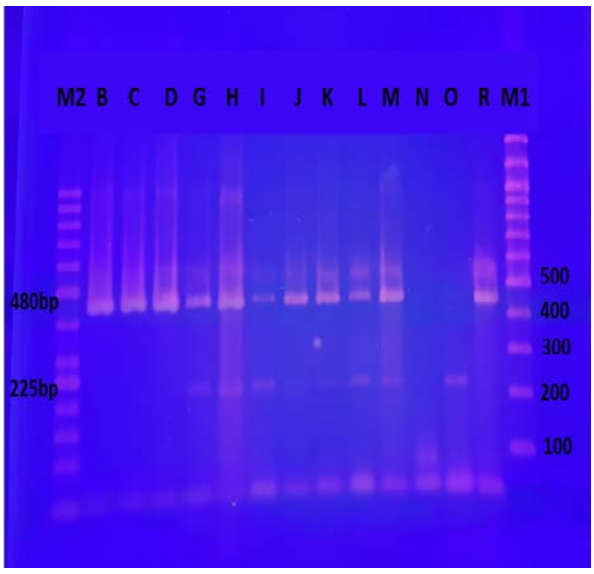
أعطت عينات البسطرمة (A)، الروستو (B, C)، السلامي (D)، النقانق (E, F)، اللانشون (G, I, R, S, U)، الهوت دوغ (M)، الكباب (V, W) والشقف(X, Y) عصابة واحدة فقط بطول bp480 أو بطول bp500 مما يدل على وجود نوع واحد من اللحوم (ثدييات أو دواجن) بينما أعطت عينات اللانشون (H, J, K) والهوت دوغ (L) عصابتان بطول bp480 و bp500 مما يدل على وجود خليط من لحوم الثدييات والدواجن، ولم تعط عينات اللانشون (N, O, P, Q, T) أية عصابات على الرغم من وجود الدنا الميتوكوندري بآلاف النسخ في الخلية مما يسمح بالحفاظ على جزء كاف من النسخ بحالة جيدة عند تعريض العينة لظروف تصنيع قاسية مما يعني عدم وجود الدنا من مصدر حيواني، أي عدم وجود اللحم في هذه العينات وهذا يتوافق مع نتائج دراسات سابقة (Girish *et al*., 2005; Di Pinto *et al*., 2007; Alshaikh *et al*., 2015; Kumar *et al*, 2015; Galal-Khallaf, 2021).

تم توحيد كمية الدنا (500 نانوغرام) المضافة الى مزيج تفاعل الـ PCR في كل العينات المدروسة، لمقارنة محتوى العينات من الدنا الحيواني نصف كمياً (شبه كمياً،) وذلك من خلال مقارنة وضوح وكثافة العصابات الناتجة من تفاعل الـ PCR للمورثة الميتوكوندرية المستهدفة في العينات المدروسة عند ترحيلها على هلامة الأغاروز 2%. لوحظ أن معظم العينات أعطت عصابة واضحة وذات كثافة جيدة مما يعني احتواء هذه العينات على كميات جيدة من الدنا الحيواني المصدر، أما عينات اللانشون (S, I) وعينة الهوت دوغ (L) فقد أعطت عصابات منخفضة الكثافة والوضوح، بينما لم تعط عينات اللانشون (T, Q, P, O, N) عصابات واضحة. وهذا يتناغم مع نتائج ترحيل الدنا المستخلص على هلامة الأغاروز 1% والتي بينت عدم وجود دنا

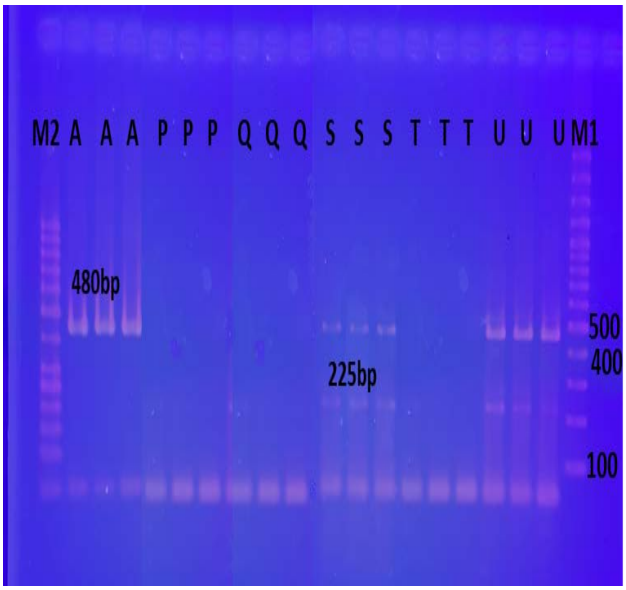
على طول البئر في عينات اللانشون (T,N) ووجود مشح ضعيف جداً للدنا في عينات اللانشون (U, S, Q, P, L, K, I) وعينة الهوت دوغ (L). أما عينة اللانشون (O) فقد أعطت مشح واضح للدنا على طول البئر ولكنها لم تعط ناتج تضخيم للمورثة الميتوركوندرية فهذا يعني احتواء هذ العينة على دنا نباتي المصدر فقط. وتوضح الأشكال (3) و(4) و(5) رحلان ناتج تضخيم جزء من المورثة الميتوكوندرية المستهدفة على هلامة آغاروز 2% لعينات نوعي الديك الرومي والعينات المدروسة.



الشكل (3): رحلان ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA لعينات دم نوع الديك الرومي البري (M.g) والديك الرومي ذو العيينات (M.o)، والعينات (E, F, V, W, X, Y) في هلامة آغاروز 2%. تمثل الآبار M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس.



الشكل (4): رحلان ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA للعينات (B, C, D, G, H, I, J, K, L, M, N, O, R, S) في هلامة آغاروز 2%. تمثل الآبار M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس.



الشكل (5): رحلان ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA للعينات (A, P, Q, S, T, U) في هلامة آغاروز 2%. تمثل الآبار M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس.

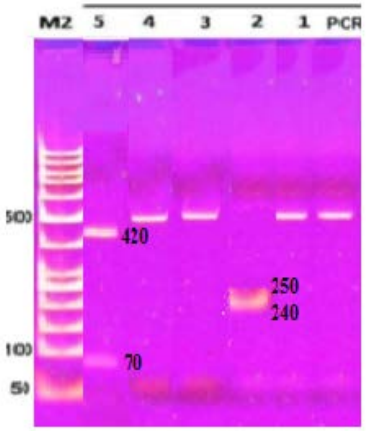
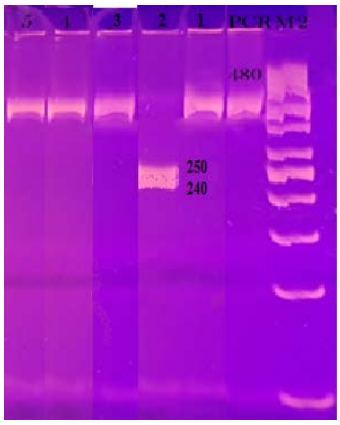
إن ظهور عصابتين على الأكثر على هلامة الترحيل يدل على عدم تأثر العصابات الناتجة عن التضخيم بالمكونات الأخرى الداخلة في تصنيع منتجات اللحوم كالبروتينات النباتية المضافة (بروتين فول الصويا) وغيرها من الإضافات (Alshaikh *et al*., 2015). لم تؤثر المعالجة الفيزيائية والحرارية للعينات أثناء تصنيع منتجات اللحوم على تضخيم الحمض النووي حيث بينت الدراسات السابقة أن درجات الحرارة العالية التي تصل حتى 160°م لم تؤثر على استقرار الحمض النووي الريبي الميتوكوندري وبالتالي يمكن اعتبار المورثة الهدف في هذه الدراسة mt 12SrRNA كمؤشر حيوي للكشف عن اللحوم في منتجات اللحوم المصنعة (Lakzadeh *et al*., 2013; Alshaikh *et al*., 2015; Cahaydi *et al*., 2020).

بالنسبة للعصابة ذات الطول bp225 الموجودة عند بعض العينات، فقد تم إجراء دراسة أولية لها من خلال دراسة تسلسل دنا هذه العصابة. تبيّن أن هذه العصابة موجودة فقط في العينات التي تحوي لحم الدجاج كأحد مكوناتها، وذلك بسبب وجود تطابق جزئي للبادئ المستخدم في تضخيم المورثة الميتوكوندرية المستهدفة مع تسلسل دنا نوع الدجاج في موقع ارتباط آخر مما يفيدنا لاحقاً بالكشف عن نوع الدجاج مباشرة دون الحاجة لاستكمال الاختبارات اللاحقة.

3.1.3. نتائج الـ PCR-RFLP:

استهدفت الدراسة الحالية تسلسل جزء قصير من المورثة الميتوكوندرية 12S rDNA بسبب تباينه الكبير بين الأنواع اذ يسمح الدنا الريبوزومي (الريباسي) بتحديد جميع العينات على مستوى النوع. وتم تضخيم المورثة باستخدام مرئسات عامة وكانت هذه المورثة فعالة بما يكفي لتحديد جميع أنواع اللحوم التي تم تحليلها في هذه الدراسة. يتعرف كل إنزيم قطع على موقع معين ضمن تسلسل نيكلوتيدي في سلسلة الدنا الهدف ويعمل على هضم (قطع) السلسلة عند هذا الموقع. يتم استثمار الاختلافات الجينية في سلسلة الدنا بين الأنواع المختلفة لإجراء القطع ومن ثم تحديد أطوال العصابات الناتجة عن القطع (نمط القطع restriction pattern) باستخدام الرحلان الكهربائي بحيث يكون نمط القطع مميز للنوع الواحد (Partis *et al*., 2000). كانت نتائج قطع ناتج تضخيم الدنا بإنزيمات القطع متطابقة لجميع المكررات العائدة لنفس العينة.

عند معاملة ناتج تضخيم المورثة المستهدفة بإنزيمات القطع المختلفة *ApoI، AluI، HhaI، MspI، BspTI* لعينات الدم المرجعية لنوع الديك الرومي البري *(Meleagris gallopavo)* والديك الرومي ذو العيينات (*Meleagris ocellata*) والتي أعطت عصابة بطول تقريبي ~500bp لوحظ في عينة الديك الرومي البري عدم حدوث هضم للعصابة بإنزيمات القطع *ApoI، HhaI، MspI*. بينما عمل إنزيم القطع *AluI* على قطع العصابة ليعطي عصابتان بأطوال التقريبية 240 bp و250bp، وعمل إنزيم القطع *BspTI* على قطع السلسلة ليعطي عصابتان بأطوال تقريبية 70bp و420bp. أما في عينة نوع **الديك الرومي ذو العيينات** لوحظ عدم حدوث هضم للعصابة بإنزيمات القطع *ApoI، HhaI، MspI، BspTI*.بينما عمل إنزيم القطع *AluI* فقط على قطع العصابة ليعطي عصابتان بأطوال التقريبية 240 bp و250bp كما في الشكل (6).

الديك الرومي البري	الديك الرومي ذو العيينات
	

الشكل (6) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات نوع الديك الرومي البري *(Meleagris gallopavo)* والديك الرومي ذو العيينات (*Meleagris ocellata*) في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

يوضح الجدول (11) أنماط القطع المميزة نوع الديك الرومي البري *(Meleagris gallopavo)* والديك الرومي ذو العيينات (*Meleagris ocellata*).

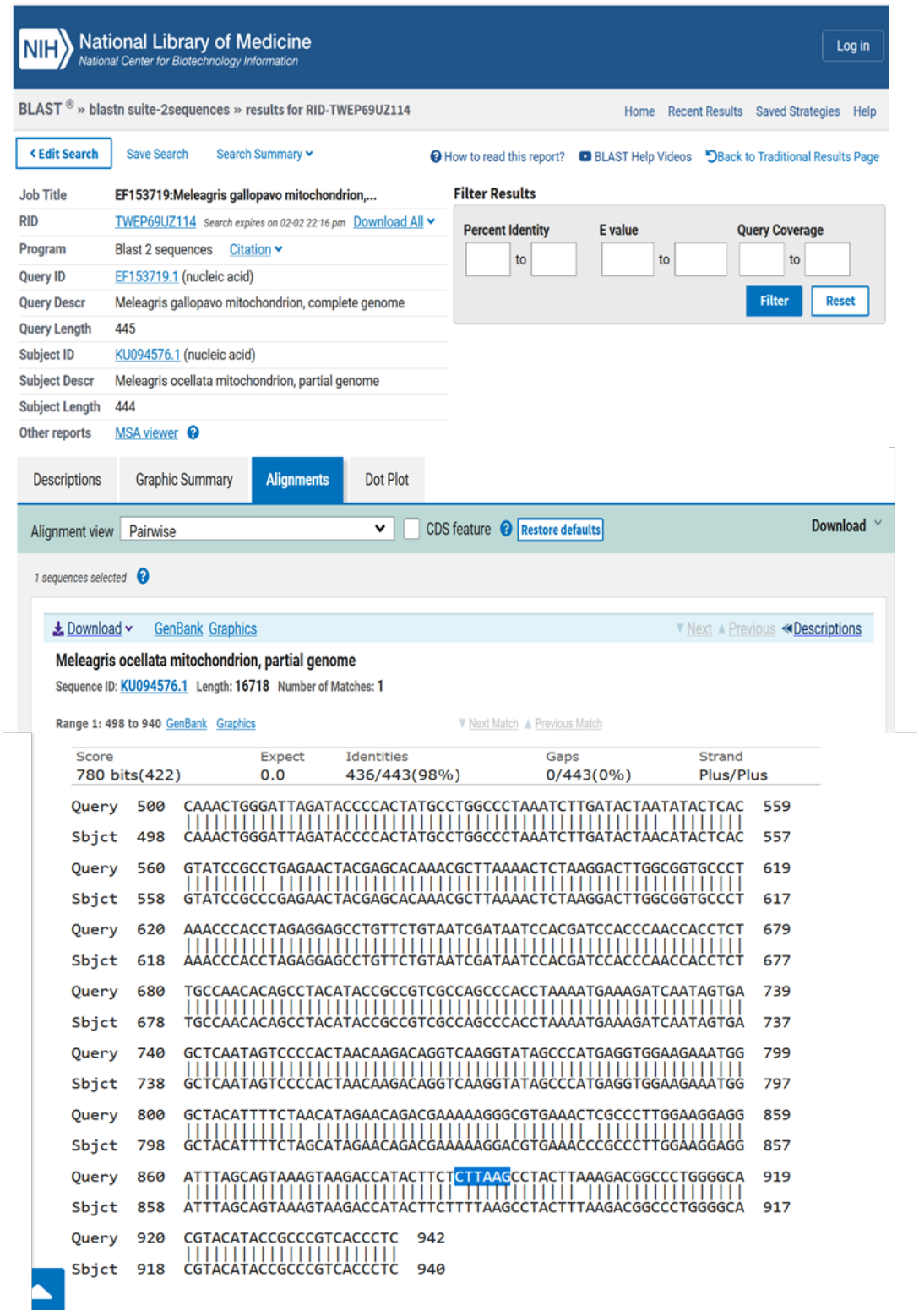
الجدول (11): أطوال القطع الناتجة عن هضم أنزيمات قطع الدنا المحددة للدنا المضخم من المورثةmt12S rDNA في نوع الديك الرومي البري و الديك الرومي ذو العيينات.

نوع اللحم	رقم البئر	1	2	3	4	5
	أنزيم القطع المحدد	*ApoI*	*AluI*	*HhaI*	*MspI*	*BspTI*
ديك رومي بري *(Meleagris gallopavo)*		-	250+240(1)	-(2)	-	420+70
ديك رومي ذو العيينات *(Meleagris ocellata)*		-	250+240	-	-	-

(1): تشير إلى طول العصابة مقدرة بـ زوج أساس (bp).

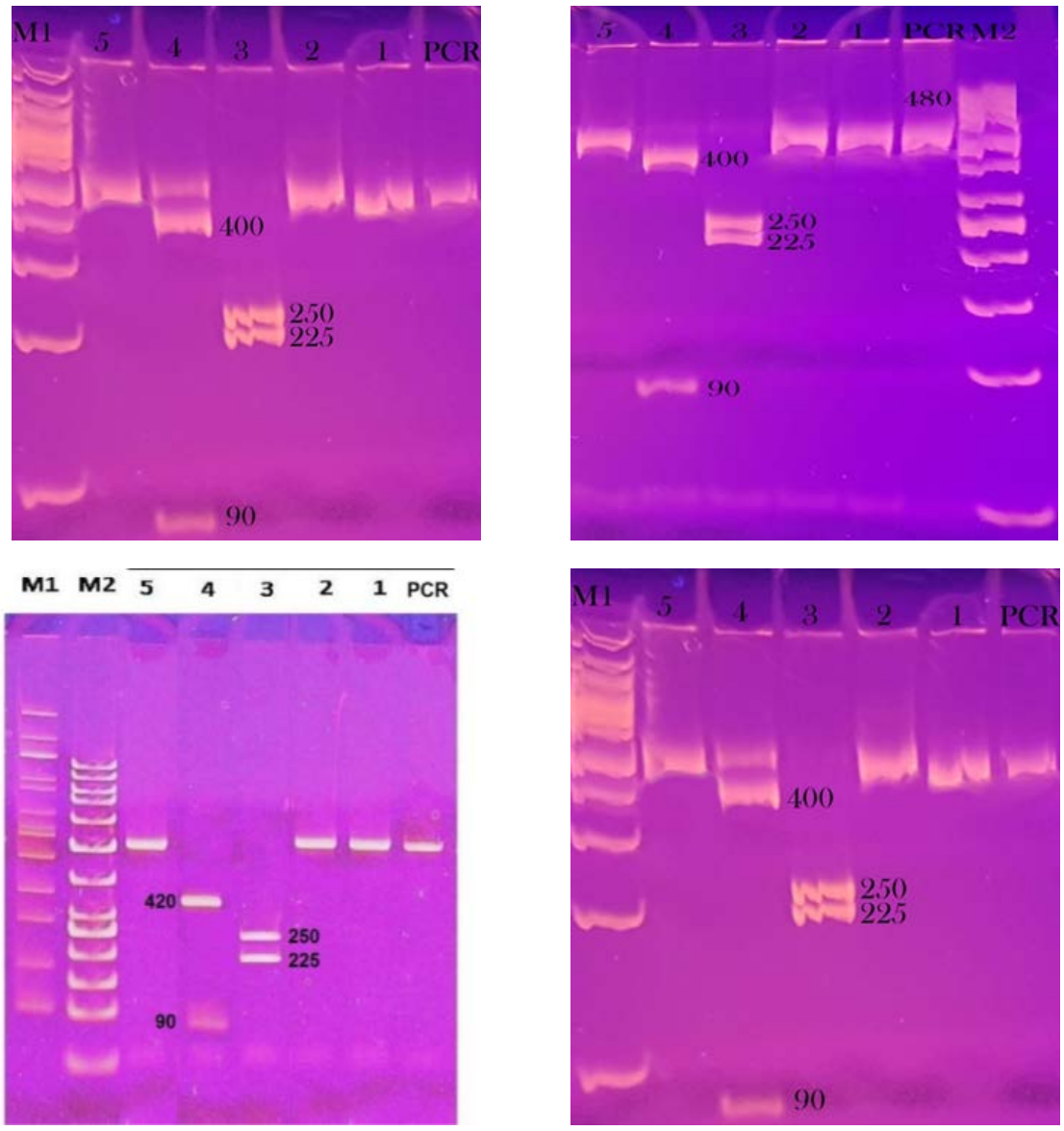
(2): تشير (–) إلى عدم حدوث هضم للدنا المضخمة من خلال أنزيم القطع المحدد

استخدمت قاعدة البيانات NCBI للبحث عن المورثة المدروسة mt 12SrRNA عند الديك الرومي البري (EF153719.1) والديك الرومي ذو العيينات (KU094576.1) وتمت مقارنة السلسلتين باستخدام برنامج blastn2 sequences وتبين أن موقع قطع الانزيم *BspTI (C\|TTAAG)* غائب من السلسلة في نوع الديك الرومي ذو العيينات، لذلك لم يقطع هذا الانزيم السلسلة، كما هو الحال عند نوع الديك الرومي البري. يوضح الشكل (7) مقارنة سلسلتي المورثة عند الديك الرومي البري والديك الرومي ذو العيينات والاختلاف في موقع قطع الانزيم *BspTI*.



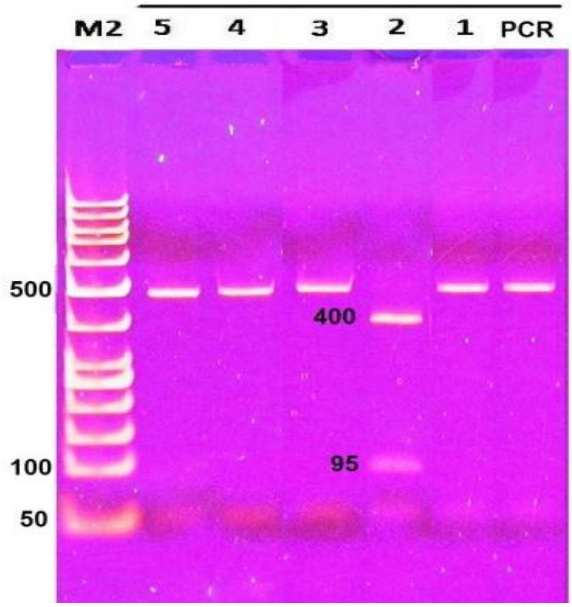
الشكل (7): مقارنة سلسلتي المورثة عند الديك الرومي البري والديك الرومي ذو العيينات والاختلاف في موقع قطع الانزيم *BspTI*.

عند معاملة ناتج تضخيم المورثة المستهدفة بإنزيمات القطع المختلفة *ApoI، AluI، HhaI، MspI، BspTI* لعينات البسطرمة(A)، الروستو (B، C) والسلامي (D) والتي أعطت عصابة بطول تقريبي ~480bp لوحظ عدم حدوث هضم للعصابة بإنزيمات القطع *ApoI، AluI و BspTI*. بينما عمل إنزيم القطع *HhaI* على قطع العصابة ليعطي عصابتان بأطوال التقريبية 225bp و250bp، وعمل إنزيم القطع *MspT* على قطع السلسلة ليعطي عصابتان بأطوال تقريبية 90bp و400bp، ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم لدنا العينات المدروسة بنفس الإنزيمات على التوالي، مع طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم لدنا نوع الجاموس (Girish *et al.*, 2004; Alshaikh *et al.*, 2015) نستنتج أن مكون عينات البسطرمة (A)، الروستو (B، C) والسلامي (D) هو **لحم الجاموس** (الشكل 8). ولدى مقارنة محتوى البسطرمة (A)، الروستو (B) والسلامي (D) من اللحم مع ما هو مذكور في محتويات بطاقة البيان والتي تشير الى وجود مكوّن واحد من اللحم وهو لحم بقري، نستنتج وجود تطابق جزئي لمكونات خلطة تصنيع هذه العينات مع بطاقة البيان. أما عينة الروستو (C) فإن بطاقة البيان الخاصة بها تشير الى وجود مكون واحد من اللحم وهو لحم البقر (وليس لحم بقري) وبالتالي فإن محتويات هذه العينة من اللحم غير متطابقة مع بطاقة البيان.



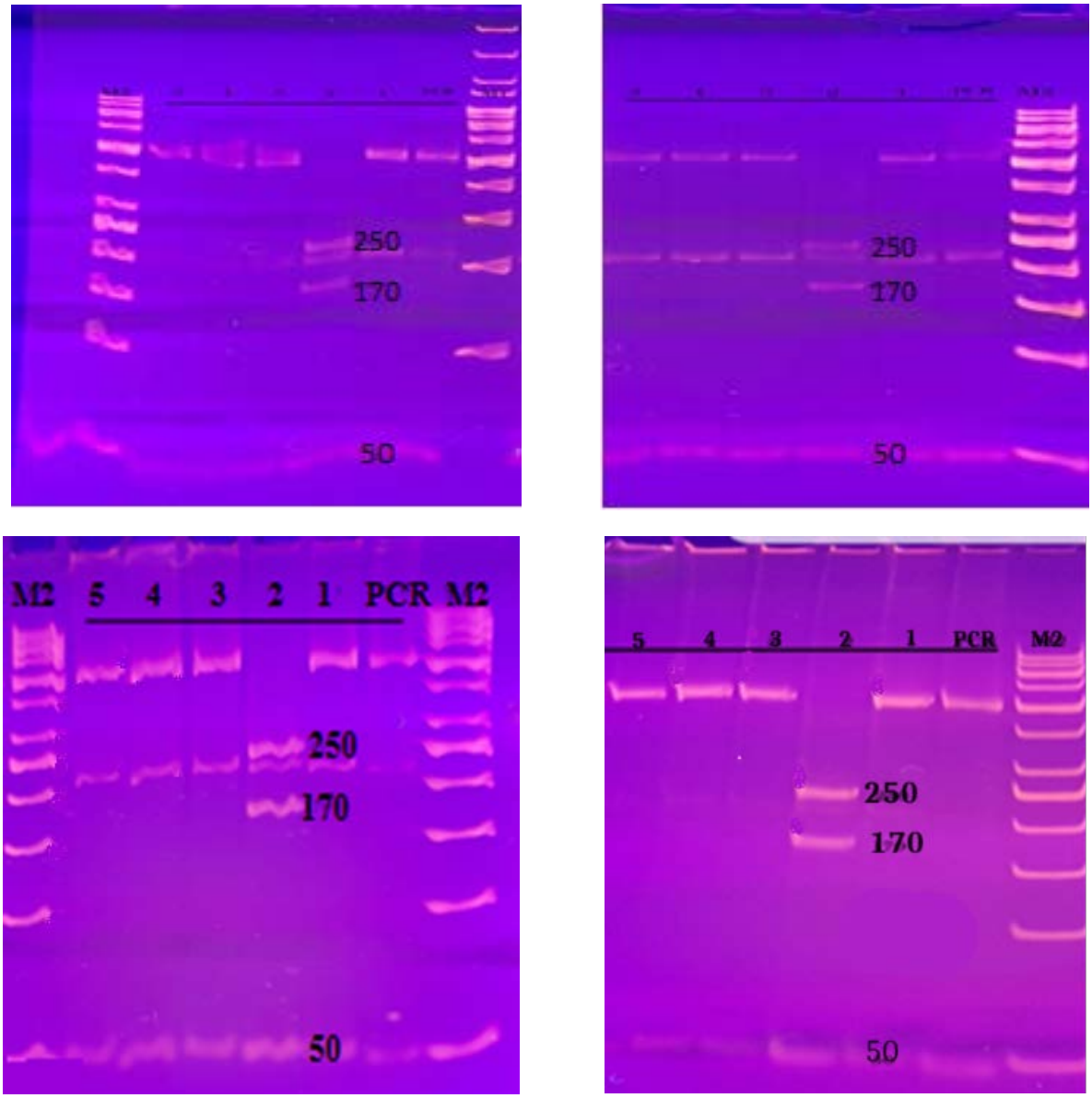
الشكل (8) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات البسطرمة(A)، الروستو (B، C) والسلامي (D) في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

عند استخدام إنزيمات القطع المختلفة *ApoI*، *AluI*، *HhaI*، *MspI*، *BspTI* لقطع ناتج تضخيم المورثة المدروسة والتي أعطت عصابة بطول تقريبي ~480 bp لعينة النقانق (E) لوحظ عدم قطع ناتج تضخيم المورثة بأنزيمات القطع *ApoI*، *HhaI*، *MspI*، *BspTI* بينما عمل الإنزيم *AluI* على قطع ناتج تضخيم المورثة ليعطي عصابتان بأطوال تقريبية 90bp و400bp، ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم بنفس الإنزيمات على التوالي مع طرز القطع المرجعية الناتجة عن قطع ناتج التضخيم لدنا نوع البقر (Girish *et al*., 2004; Alshaikh *et al*., 2015) نستنتج أن المكون الرئيسي لعينة النقانق (E) **هو لحم البقر** (الشكل 9). ولدى مقارنة محتوى عينة نقانق البقر (E) من اللحم مع معلومات البائع على أنها محضرة من لحم البقر نستنتج وجود تطابق بين مكونات هذه العينات مع معلومات البائع.

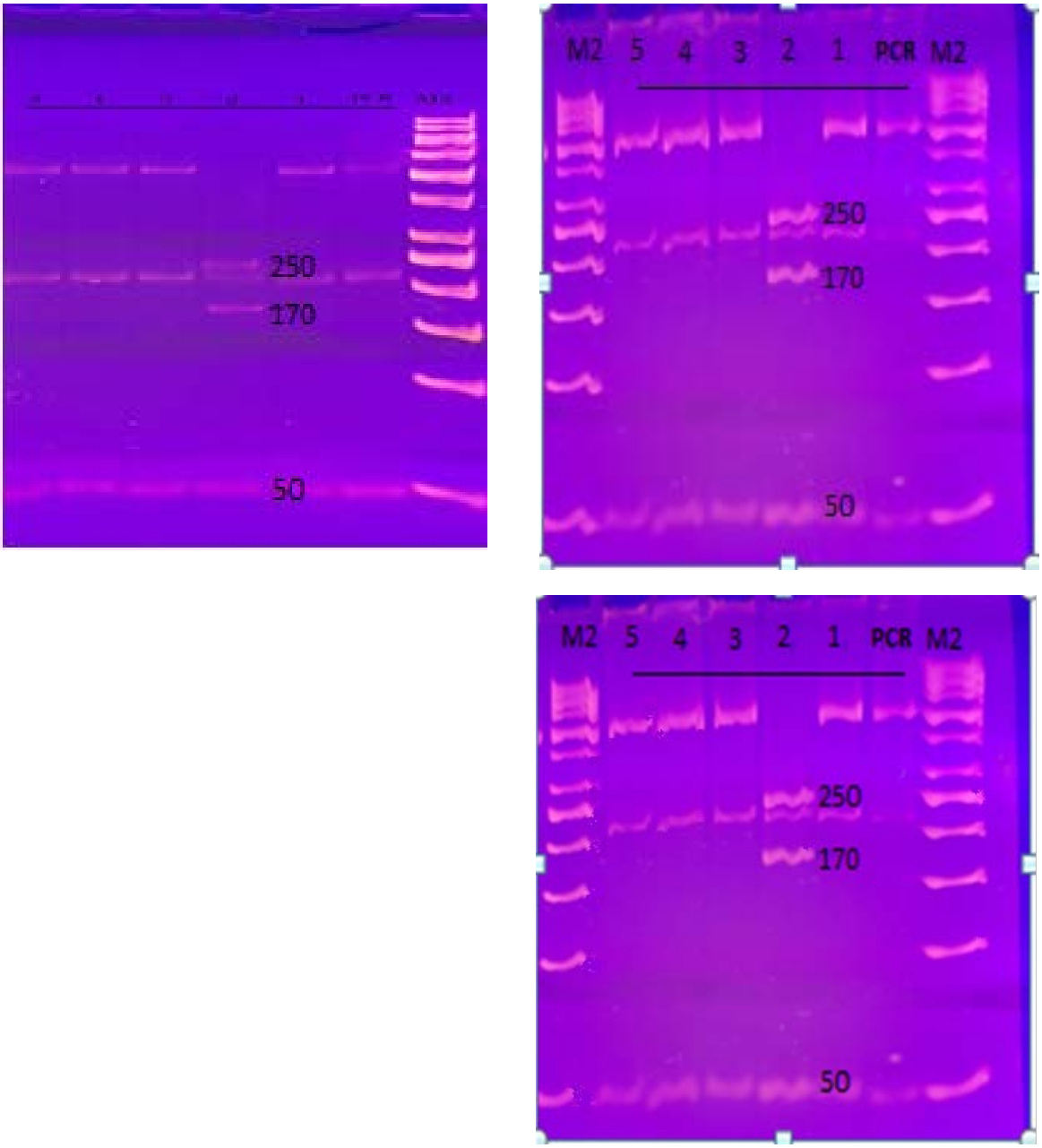


الشكل (9) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة للعينة E في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

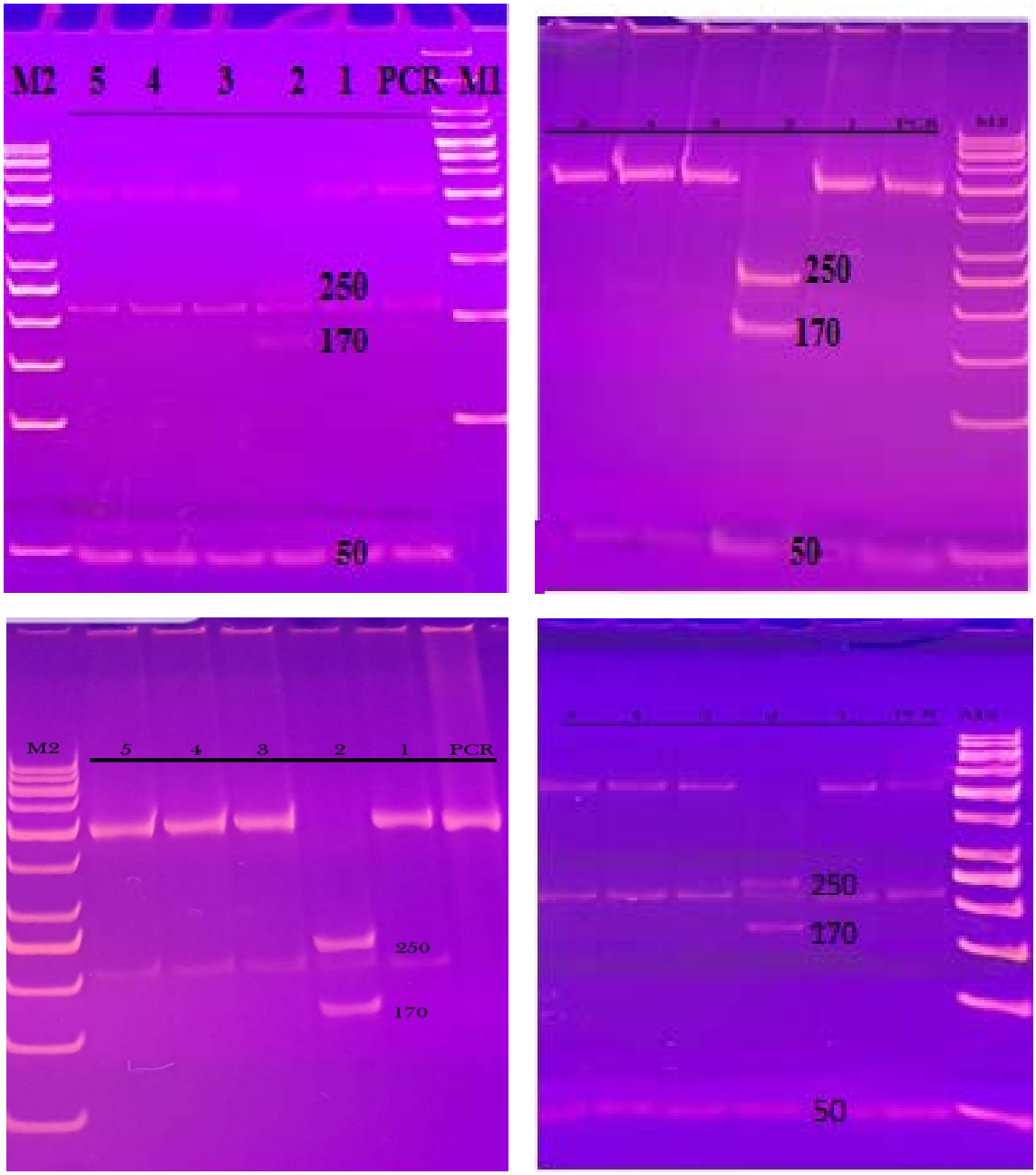
عند استخدام إنزيمات القطع المختلفة *ApoI*، *AluI*، *HhaI*، *MspI*، *BspTI* لقطع ناتج تضخيم المورثة المدروسة والتي أعطت عصابة بطول تقريبي ~500 bp، لعينات النقانق (F)، اللانشون (G، I، R، S، U)، الهوت دوغ (M) الكباب (V، W) والشقف (X، Y)، لوحظ عدم قطع ناتج تضخيم المورثة بأنزيمات القطع *ApoI*، *HhaI*، *MspI*، *BspTI* هذا يدل على عدم وجود مواقع خاصة لعمل هذه الأنزيمات على طول السلسة المضخمة وبالتالي بقاء العصابة على حالها (طول العصابة 500bp). بينما عمل الإنزيم *AluI* على قطع ناتج تضخيم المورثة ليعطي ثلاث عصابات بأطوال تقريبية 50bp و170bp و250bp ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم بنفس الإنزيمات على التوالي مع طرز القطع المرجعية الناتجة عن قطع ناتج التضخيم لدنا نوع الدجاج (Girish *et al*., 2004; Alshaikh *et al*., 2015) نستنتج أن المكون الرئيسي لعينات النقانق (F)، اللانشون (G، I، R، S، U)، الهوت دوغ (M) الكباب (V، W) والشقف (X، Y) هو **لحم الدجاج** كما في الأشكال (10) و(11) و(12). ولدى مقارنة محتوى عينات النقانق (F)، اللانشون (G، I، R، S، U)، الهوت دوغ (M) الكباب (V) والشقف (X)، من اللحم مع ما هو مذكور في محتويات بطاقة البيان والتي تشير الى وجود مكوّن واحد من اللحم وهو لحم الدجاج نستنتج وجود تطابق بين مكونات العينات مع بطاقة البيان ومع معلومات البائع. أما عينة الكباب (W) وعينة الشقف (Y) فهي غير متوافقة مع معلومات البائع إذ أنها محضرة من الدجاج بدلاً من ديك الحبش، إذ غالباً ما يتم تسويق لحم الديك البلدي على كونه لحم حبش كنوع من الغش بدوافع اقتصادية لتحقيق المزيد من الأرباح.



الشكل (10) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات النقانق (F)، اللانشون (G، I، R)، في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

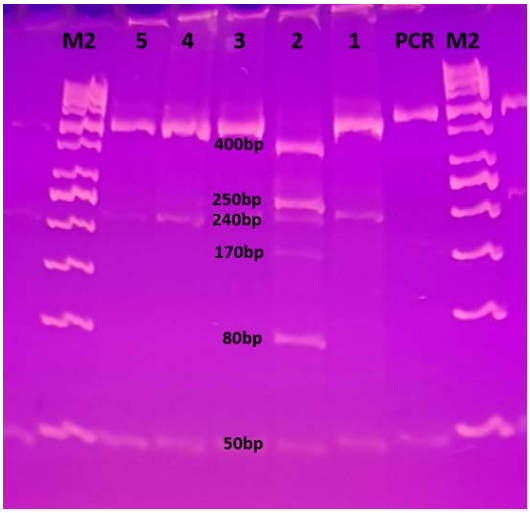


الشكل (11) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات اللانشون (S، U) والهوت دوغ (M) في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.



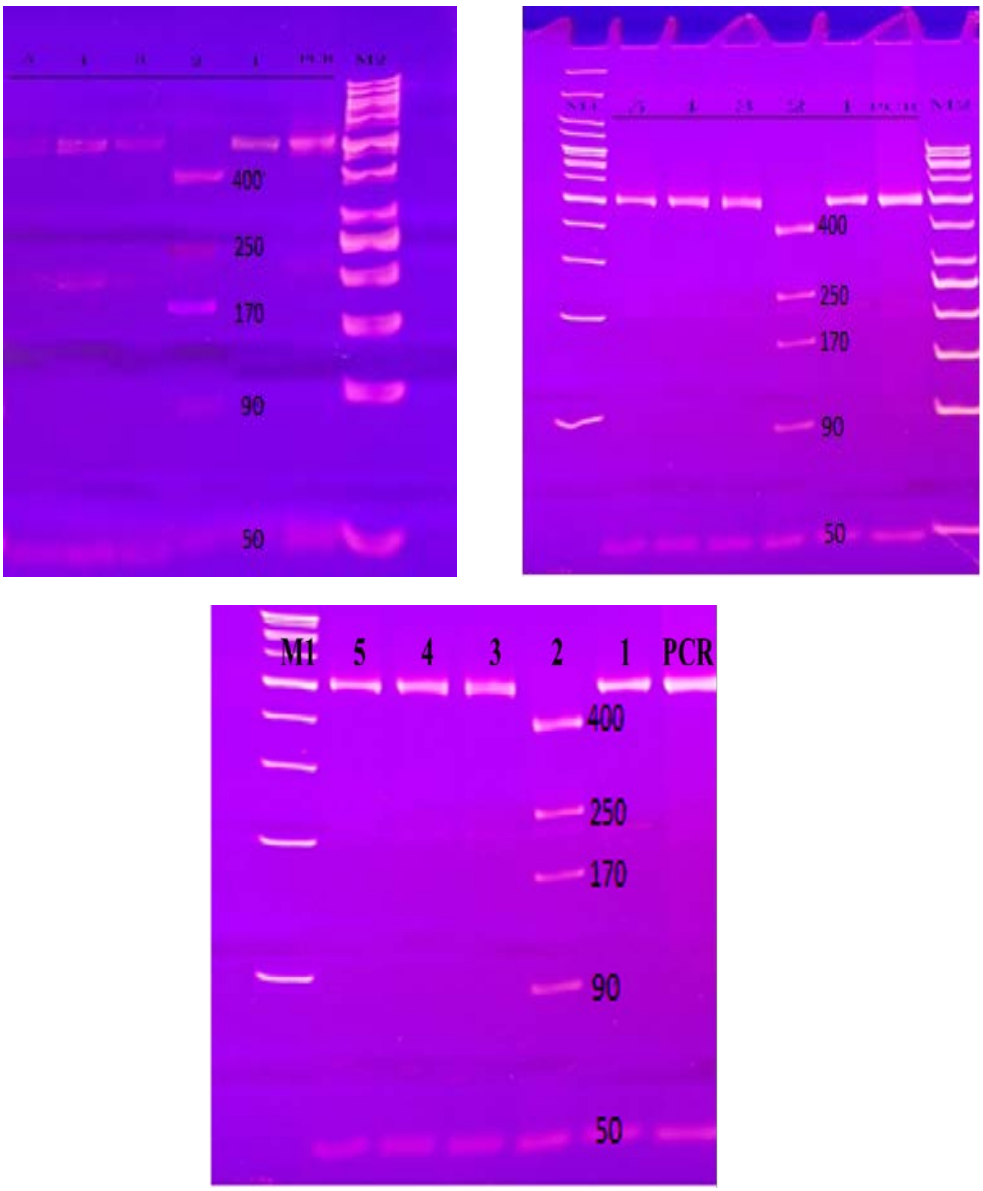
الشكل (12) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة لعينات الكباب (V، W) والشقف (X، Y) في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

أما عند معاملة منتجات التضخيم بإنزيمات القطع المختلفة *ApoI، AluI، HhaI، MspI، BspTI* في عينة اللانشون (H) والتي أعطت عصابتان، عصابة بطول تقريبي ~500bp وعصابة بطول تقريبي ~480bp، لوحظ عدم حدوث هضم للعصابتان بإنزيمات القطع *ApoI، HhaI، MspI، BspTI* . بينما عمل إنزيم القطع *AluI* على قطع العصابتان ليعطي ستة عصابات بالأطوال التقريبية 50bp و90bp و170bp و 240 bp و250bp و400bp، (العصابة بطول 250 bp مشتركة بين الدجاج والحبش ذو العيينات). ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم بنفس الإنزيمات على التوالي مع طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم لدنا نوع الدجاج والحبش ذو العيينات والبقر (Girish *et al.*, 2004; Alshaikh *et al.*, 2015) نستنتج أن مكون عينة اللانشون (H) هو**خليط من لحوم كل من الدجاج والحبش ذوالعيينات والبقر**(الشكل 13). ولدى مقارنة محتوى عينة اللانشون (H) من اللحم مع ما هو مذكور في محتويات بطاقة البيان والتي تشير الى وجود خليط من اللحم (بقر ودجاج وحبش) نستنتج وجود تطابق مكونات خلطة تصنيع العينة مع بطاقة البيان.



الشكل (13) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة للعينة H في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

أما عند معاملة منتجات التضخيم بإنزيمات القطع المختلفة *ApoI، AluI، HhaI، MspI، BspTI* في عينات اللانشون (J، K) وعينة الهوت دوغ (L) والتي أعطت عصابتان، عصابة بطول تقريبي ~500bp وعصابة بطول تقريبي ~480bp لوحظ عدم حدوث هضم للعصابة بإنزيمات القطع *ApoI، HhaI، MspI، BspTI*. بينما عمل إنزيم القطع *AluI* على قطع العصابتان ليعطي خمس عصابات بالأطوال التقريبية 50bp و90bp و170bp و250bp و400bp ولدى مقارنة طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم بنفس الإنزيمات على التوالي مع طرز القطع الناتجة عن قطع ناتج التضخيم لدنا نوع الدجاج ودنا نوع لحم البقر (Girish *et al*., 2004; Alshaikh *et al*., 2015) نستنتج أن مكون عينات اللانشون (J، K) وعينة الهوت دوغ (L) هو **لحم الدجاج ولحم البقر** (الشكل 14). ولدى مقارنة محتوى عينات اللانشون (J، K) وعينة الهوت دوغ (L) 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 هذه العينة مع بطاقة البيان.



الشكل (14) رحلان كل من ناتج التضخيم لجزء من المورثة mt 12S rDNA وناتج قطع الدنا المضخمة للعينات J، K و L في هلامة عديد الأكريلاميد. تمثل جميع الآبار على طول الهلامة المحتوى التالي: M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، PCR: ناتج التضخيم، 1: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع ApoI، 2: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع AluI، 3: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع HhaI، 4: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع MspI، 5: معاملة ناتج التضخيم بإنزيم القطع BspTI.

لم تعط عينات اللانشون (N، O، P، Q وT) عصابة واضحة عند ترحيل ناتج تضخيم المورثة على هلامة متعدد الأكريلاميد، حتى عند زيادة تركيز الدنا الداخل في تفاعل الـ PCR. وبالتالي لم يتم اجراء هضم لناتج تضخيم هذه العينات بإنزيمات القطع الخمسة، وبالنتيجة عدم تطابق مكونات خلطة هذه العينات مع مكونات بطاقة البيان. وقد تم تلخيص النتائج في الجدول (12).

الجدول (12): طرز القطع الناجمة عن قطع إنزيمات القطع المحددة للدنا المضخمة لقطعة من المورثة الميتوكوندرية 12SrDNA للعينات المدروسة.

العينة	ناتج تضخيم المورثة	إنزيم القطع المحدد					التطابق مع بطاقة البيان
		ApoI	AluI	HhaI	MspI	BspTI	
A	480	-	-	225+250	80+400	-	مطابق
B	480	-	-	225+250	80+400	-	مطابق
C	480	-	-	225+250	80+400	-	غير مطابق
D	480	-	-	225+250	80+400	-	مطابق
E	480	-	80+400	-	-	-	مطابق
F	500	-	50+170+250	-	-	-	مطابق
G	500	-	50+170+250	-	-	-	مطابق
H	480	-	50+80+170+240+ 250+400	-	-	-	مطابق
I	480+500	-	50+80+170+250+400	-	-	-	مطابق
J	480+500	-	50+80+170+250+400	-	-	-	مطابق
K	480+500	-	50+80+170+250+400	-	-	-	مطابق
L	480	-	80+400	-	-	-	مطابق
M	500	-	50+170+250	-	-	-	مطابق

N	**X**		**غير مطابق**				
O	**X**		**غير مطابق**				
P	**X**		**غير مطابق**				
Q	**X**		**غير مطابق**				
R	**500**	-	**50+170+250**	-	-	-	مطابق
S	**500**	-	**50+170+250**	-	-	-	مطابق
T	**X**		**غير مطابق**				
U	**500**	-	**50+170+250**	-	-	-	مطابق
V	**500**	-	**50+170+250**	-	-	-	مطابق
W	**500**	-	**50+170+250**	-	-	-	**غير مطابق**
X	**500**	-	**50+170+250**	-	-	-	مطابق
Y	**500**	-	**50+170+250**	-	-	-	**غير مطابق**

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن الغالبية العظمى من المنتجات تحتوي في الغالب على الأنواع المعلنة وهذا أمر مشجع ولكن يوجد مستوى منخفض من بدائل الأنواع حيث تم استبدال كلي للحم البقر بلحم الجاموس في عينات البسطرمة والسلامي والروستو وكذلك استبدال كلي للحم الحبش بلحم الدجاج في عينات الشقف والكباب. لا يمكن اعتبار هذه البدائل غير مقصودة نظراً لارتفاع سعر لحم البقر ولحم الحبش مقارنة مع لحم الجاموس ولحم الدجاج على التوالي، إضافة الى تشابه كل من لحم البقر والجاموس وكذلك كل من لحم الدجاج والحبش في الملمس والطعم واللون وبخاصة عند إزالة الرأس والاجنحة. أشارت العديد من الدراسات في جميع أنحاء العالم عن وجود تسميات خاطئة لمحتوى الأنواع الحيوانية في منتجات اللحوم المصنعة بما في ذلك اللحم المفروم والنقانق والبرغر وإن النتائج المستحصلة من هذه الدراسة تتوافق مع نتائج الدراسات السابقة، إذ بينت هذه الدراسات أن هناك غش واحتيال في بطاقات البيان وخاصة بلحم الجاموس الأكثر تواجداً في أنواع اللحوم غير المصرح عنها لأنه أرخص ثمناً (Chuah *et al*., 2016; Al-Kahtani *et al*., 2017; Ha *et al*., 2017;

(Keyvan *et al*., 2017; Naaum *et al*, 2018). وقد بينت دراسة تمت في كندا أن ثلث منتجات لحم الحبش في كندا قد تم استبدالها بالكامل بلحم الدجاج لدوافع اقتصادية (Naaum *et al*., 2018). كما أظهرت دراسة أخرى أن جميع منتجات لحم الدجاج كانت إيجابية للحم الدجاج فقط أي أنه لا يوجد غش في منتجات لحم الدجاج ولم يتم العثور على لحم الخنزير ولحوم الحيوانات الأخرى غير المسموحة دينياً ويعود السبب في الغالب لكون لحوم البقر والجاموس وغيرها من أنواع اللحوم أعلى من أسعار لحوم الدجاج (Uddin *et al*., 2021)، وبالتالي يمكن اعتبار ذلك بمثابة غش غذائي بدوافع اقتصادية وهذا ما ذكره (Dooley *et al*., 2004; Everstine *et al*., 2013; Galal-Kallaf *et al*, 2016; Ha *et al*., 2017). ولذلك يجب إلزام المنتجين بذكر الاسم العلمي أو أصل النوع على بطاقة بيان المنتج لتجنب حدوث مثل هذه الممارسات الاحتيالية.

بالإضافة الى الأنواع الحيوانية الموضحة على بطاقة بيان المنتج فقد تم أيضا فحص عينات منتجات اللحوم بحثاً عن وجود أنواع حيوانية غير معلن عنها حيث أظهرت النتائج أن جميع العينات المدروسة لم تحتوي على لحوم الخنزير أو الحصان أو الحمار أو غيرها من اللحوم غير المقبولة دينيا وهذا أمر مشجع أيضاً (Sreenivasan and Viljoen, 2021). وبالتالي فإن أحد أنواع الغش في اللحوم الأكثر انتشاراً في البلاد الإسلامية يتضمن الاستبدال الكلي أو الجزئي للحم البقر بلحم الجاموس أو الاستبدال الجزئي للحم البقر بلحم الدجاج المنزوع العظم ميكانيكاً وكذلك استبدال الحبش بالدجاج (Abuzinadah *et al*., 2015; Keyvan *et al*., 2017).

إن هذه التقنية متعددة الاستعمالات، فيمكنها كشف مصادر أنواع الكائنات في العديد من المواد الحيوية المحتوية على الدنا إذ بينت دراسات عديدة أن طريقة الـ PCR-RFLP يمكن استخدامها كبديل موثوق لدراسة تسلسل الحمض النووي لتحديد أنواع اللحوم (Girish *et al*., 2004; Girish *et al*., 2005; Mahajan *et al*., 2011; Galal-Khallaf, 2021). كما أنها بسيطة وسهلة التنفيذ وأقل استهلاكاً للوقت وتحتاج كمية منخفضة من الحمض النووي وأرخص بكثير من دراسة تسلسل الحمض النووي بالإضافة الى ذلك فهي لا تتطلب معدات متطورة أو مهارات تقنية عالية (Girish *et al*, 2005; Sivaraman *et al*, 2018; Uddin *et al*,

2021). إن اعتماد هذه التقنية على تضخيم مورثة ميتوكوندرية موجودة بآلاف النسخ في الخلية الواحدة يزيد من حساسية هذه الطريقة (Girish *et al.*, 2005; Rashid *et al*, 2015; Galal-Khallaf, 2021; Uddin *et al*, 2021).

2.3. نتائج الكشف عن فول الصويا والتعديل الوراثي:

1.2.3. نتائج استخلاص الدنا:

أظهرت النتائج أن طريقة استخلاص الحمض النووي المستخدمة في هذه الدراسة باستخدام طاقم العزل من شركة Qiagen وطاقم العزل من شركة Promega قد سمحت باستخلاص الحمض النووي لفول الصويا القابل للتضخيم من عينات فول الصويا المجفف المرجعية ومن عينات اللحوم المعاملة حرارياً وعينات اللحوم المصنعة. لذلك يمكن استخدام طاقم العزل من شركة Qiagen فقط لاستخلاص الدنا الكلي (الحيواني والنباتي) بقيم عزل ونوعية جيدة للدنا.

2.2.3. نتائج تضخيم الدنا:

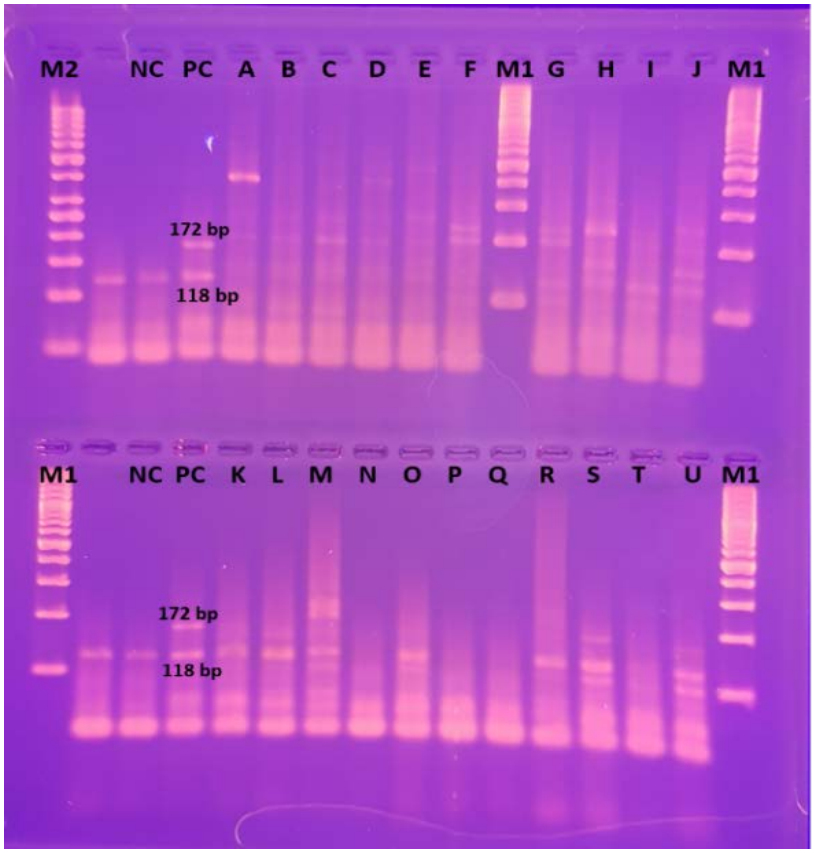
تقوم معظم الدراسات السابقة بإجراء تحليل من ثلاث خطوات لمعرفة التعديل الوراثي حيث يتم في البداية تضخيم مورثة اللكتين باستخدام مرئسات نوعية لتعطي عصابة بطول 118 bp (Meyer, 1996; Forte *et al.*, 2005) ومن ثم تضخيم المورثة النوعية المميزة للتعديل الوراثي NOS Terminator أو 35S Promoter أو كلتاهما للتحري عن إجراء التعديل الوراثي في العينات الايجابية لمورثة اللكتين (Fraiture *et al*., 2016; Safaei *et al*., 2019). وأخيراً فإن العينات الايجابية للتعديل الوراثي يتم اخضاعها للكشف عن المادة المعدلة في فول الصويا من النوع (RR) المقاوم لمبيدات الأعشاب (Wurz *et al*., 1999; Lin *et al*., 2000). ولكن في هذا البحث تم تطوير الطريقة بحيث يمكن الكشف عن مورثة اللكتين الخاصة بفول الصويا لتعطي عصابة بطول 118 bp وعن المورثة الخاصة بالتعديل الوراثي من النوع RR لتعطي عصابة بطول bp172 وبنفس التفاعل وذلك من خلال تطبيق طريقة تضخيم البوليميراز التسلسلي المزدوج Duplex PCR. وتم أيضاً إجراء

اختبار PCR إضافي لمورثة NOS للعينات المدروسة لتعطي عصابة بطول 151 bp وذلك للتحري عن التعديل الوراثي بشكل عام.

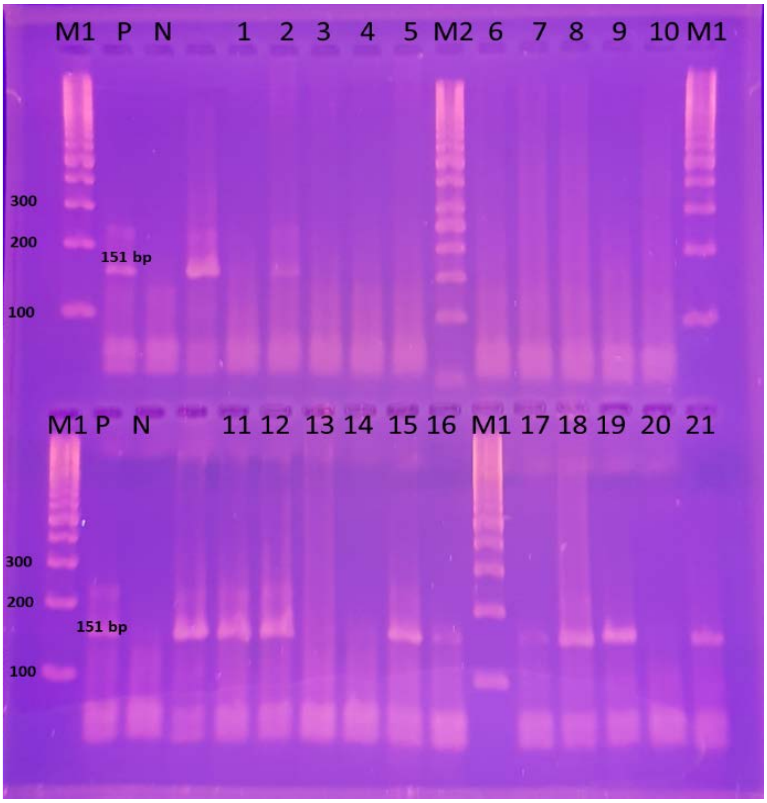
أظهرت النتائج أن 11 عينة من أصل 21 عينة كانت ايجابية لمورثة اللكتين نظراً لوجود العصابة بطول 118 bp عند الترحيل على هلامة الآغاروز 2% وهذا يعني وجود فول الصويا كأحد مكوناتها ولكن في 7 عينات منها، أشارت بطاقة البيان الخاصة بها الى وجود بروتين نباتي دون الاشارة الى وجود فول الصويا، وهذا يخالف القواعد الغذائية التي تنص على ضرورة توضيح وجود الصويا على بطاقة البيان لأن فول الصويا يعد واحداً من مسببات الحساسية الغذائية لبعض الأشخاص حتى وإن كان وجوده بنسب ضئيلة جداً لما لذلك من عواقب صحية خطيرة (European Commission, 2007) .

كما أظهرت النتائج أن 4 عينات لا تحتوي فول الصويا على الرغم من أن بطاقة البيان تشير إلى وجوده كأحد مكوناتها حسب بطاقة البيان الخاصة بكل منتج، و6 عينات تحوي بروتين نباتي غير فول الصويا حسب بطاقة البيان. وهذا يتوافق مع دراسة تمت في البرتغال عند تطبيق طرائق الـ PCR على 18 عينة سجق تجاري لمنتجات اللحوم في البرتغال حيث تم تأكيد وجود فول الصويا المعلن في 9 عينات وكذلك وجود فول الصويا في 4 عينات غير معلن عنه (Soares *et al*., 2010)، وفي اسبانيا أيضاً تمت دراسة استقصائية للمنتجات الغذائية الاسبانية حيث احتوت 7 منتجات من أصل 10 منتجات لحوم مختلفة على فول صويا غير مصرح به .(Espineira *et al*., 2010)

أظهرت النتائج أيضاً أن 10 عينات من أصل 21 عينة فيها مواد معدلة وراثياً، 9 عينات منها تحوي فول الصويا المعدل وراثياً نظراً لوجود العصابة بطول 151 bp الدالة على وجود المورثة NOS وعينة واحدة تحوي بروتين نباتي معدل وراثياً، كما أظهرت النتائج أن 3 عينات منها تحوي فول الصويا المعدل وراثياً من النوع RR نظراً لوجود عصابة بطول 172 bp الدالة على وجود المورثة الخاصة بالتعديل الوراثي من النوع RR كما في الشكلين (15) و(16).



الشكل (15): رحلان ناتج تضخيم Duplex PCR لعينات اللحوم المصنعة المدروسة في هلامة آغاروز 2%. تمثل الآبار M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، NC: الشاهد السلبي (0% RR)، PC: الشاهد الإيجابي (10% RR).



الشكل (16): رحلان ناتج تضخيم PCR مورثة التعديل الوراثي NOS لعينات اللحوم المصنعة المدروسة في هلامة آغاروز 2%. تمثل الآبار M1: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفارق 100 زوج أساس، M2: سلم الدنا المحدد لطول الدنا بفروق 50 زوج أساس، NC: الشاهد السلبي (0% RR)، PC: الشاهد الإيجابي (10% RR).

وهذا يتوافق مع نتائج دراسة مماثلة تمت في السعودية لـ 72 عينة لمنتجات لحوم مصنعة باستخدام تفاعل الـ PCR لتضخيم مورثة اللكتين في فول الصويا والكشف النوعي عن الكائنات المعدلة وراثياً لكل من 35S و NOS وكانت جميع العينات إيجابية لمورثة اللكتين و45 عينة إيجابية للمورثة الخاصة بفول الصويا من النوع RR حيث لم تشير بطاقة البيان إلى وجود المواد المعدلة وراثياً (Elsanhoty, 2013). يلخص الجدول رقم (13) نتائج تحليل المواد المعدلة وراثياً في مصنعات اللحوم اعتماداً على Duplex PCR لمورثة اللكتين ومورثة التعديل الوراثي الخاصة بمقاومة المبيدات RR وعلى PCR لمورثة التعديل الوراثي NOS.

الجدول (13): نتائج تحليل المواد المعدلة وراثياً في مصنعات اللحوم اعتماداً على Duplex PCR:

نوع العينة	عدد العينات	مورثة اللكتين	NOS	RR
بسطرمة	1	-	-	-
روستو	2	-	1	-
سلامي	1	-	-	-
نقانق	2	-	-	-
لانشون	12	9	8	3
هوت دوغ	3	2	1	-

يشير وجود فول الصويا ومواد معدلة وراثياً غير معلن عنها في بطاقة بيان الأغذية الى الحاجة الى مراقبة أصالة الأغذية. وفي الحالات التي لا يكون من المجدي عملياً منع الوجود العارض لمواد غير مرغوبة على الرغم من الالتزام بأعلى معايير الإنتاج، فمن المستحسن للمصنعين وضع علامات احترازية على بطاقة البيان (Ashrafi-Dehkodi, Mazloomi and Hemmati, 2021).

على الرغم من أن هناك العديد من المحاصيل والأعلاف والأغذية يتم استيرادها دوماً إلا أن مراقبة وتقييم هذه المستوردات يعتمد فقط على محتواها من العناصر الغذائية والمستوى المقبول من السموم الفطرية دون الانتباه إلى التعديل الجيني وبالتالي لا يوجد تقرير واضح عن وجود المحاصيل والأعلاف والأغذية المعدلة وراثياً في سوريا.

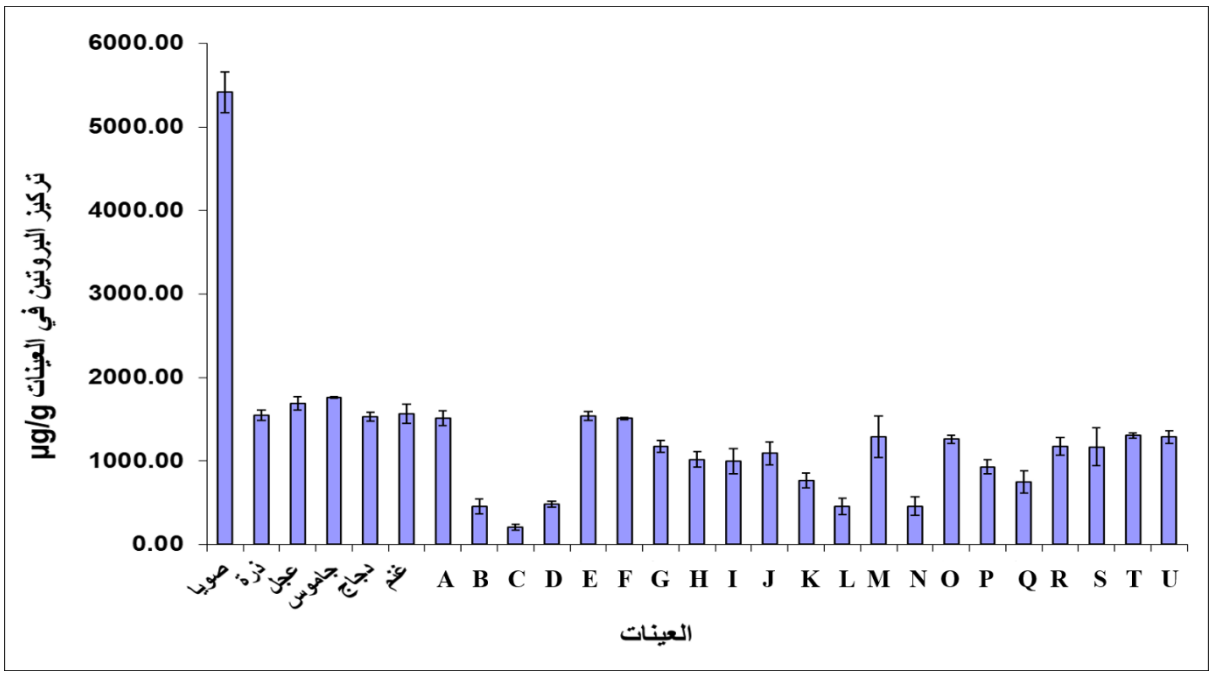
3.3. نتائج التحديد الكمي للبروتينات الكلية المنحلة:

أُعتمد في هذه الدراسة على طريقة برادفورد (1976) لتقدير محتوى البروتينات الكلية المنحلة، بطريقة أسرع وأقل خطورة مقارنة مع طريقة كيلداهل التقليدية والمستخدمة رسمياً.

حُدد تركيز البروتينات الكلية المنحلة باستخدام معادلة الخط المستقيم التي تم الحصول عليها من المحلول القياسي لألبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin (BSA) من شركة (Segma, USA) وبتراكيز (0، 31.25، 62.5، 125، 250، 500، 1000 ,2000) ميكروغرام/ مل ومحلول برادفورد (X1)، ثم أُخذت القراءات باستخدام جهاز الطيف الضوئي على طول موجة 595 نانومتر.

تُظهر النتائج المبينة في الشكل (17) أن عينات البسطرمة (A) والنقانق (E و F) أعطت أعلى نسبة للبروتينات المنحلة وكانت بحدود 1.5 ملغ/غ. بينما تراوحت نسبة البروتينات المنحلة في عينات اللانشون (G، H، I، J، O، R، S، Tو U) والهوت دوغ (M) من 1 الى 1.3 ملغ /غ، أما في عينات الروستو (B، C)، السلامي (D)، اللانشون (K، N، P، Q) والهوت دوغ (L)، فقد تراوحت نسبة البروتينات المنحلة فيها بين 0.2 الى 0.93 ملغ/ غ. وبالعودة الى نتائج رحلان الدنا ورحلان تضخيم جزء من المورثة الميتوكوندرية 12SrRNA ومورثة اللكتين للعينات المدروسة، يمكننا القول بأن العينات التي احتوت على أعلى نسبة للبروتينات المنحلة أعطت أيضاً نتائج جيدة لاستخلاص الدنا وعصابات واضحة عند تضخيم الدنا مما يعني أن هذه العينات تحوي نسبة عالية من البروتينات الحيوانية (اللحم) كما أنها لم تتعرض لمعاملات حرارية قاسية خلال تصنيعها. أما العينات التي تراوحت فيها نسبة البروتينات المنحلة بين 1-1.3 ملغ /غ فقد احتوت على نسبة عالية من البروتينات الحيوانية (اللحم) 80% وأكثر حسب بطاقة البيان وعلى بروتينات نباتية كفول الصويا مثلا بنسبة جيدة أيضاً، ولكن عينة اللانشون (O) احتوت على بروتينات نباتية فقط بما فيها بروتين فول الصويا أما عينة اللانشون (T) فقد احتوت على بروتينات نباتية فقط خلافا لما ذكر في بطاقة البيان الخاصة بكل منها مما يعني تعرض هذه العينات لمعاملات ميكانيكية وكيميائية وحرارية قاسية أدت الى تخرب الدنا بشكل كبير أو أن الشركة المنتجة لم تلتزم بنسب خلطات التصنيع المناسبة. أما العينات التي تراوحت فيها نسبة البروتينات المنحلة فيها

بين 0.2 و0.93 ملغ/غ يمكننا القول بأنها احتوت على الحد الأدنى من اللحوم دون وجود فول الصويا فيها كما في عينات الروستو (B، C) والسلامي (D)، أو أنها احتوت على الحد الأدنى من اللحوم وفول الصويا كما في عينات اللانشون (K) والهوت دوغ (L)، أو أنها احتوت على بروتينات نباتية فقط كما في عينات اللانشون (N، P و Q).



الشكل رقم (17): تركيز البروتينات الكلية المنحلة في الخلاصات البروتينية للعينات المدروسة وعينات عدة لحوم مرجعية وعينات نباتية. النتائج هي المتوسط والانحراف المعياري لثلاثة مكررات تجريبية.

4. الاستنتاجات

- ✓ كانت معظم العينات مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها، بينما كانت عينات الروستو (C)، اللانشون (N، O، P، Q، T)، الكباب (W) والشقف (Y)، غير مطابقة لبطاقة البيان الخاصة من حيث نوع اللحوم.
- ✓ كانت عينات البسطرمة (A)، الروستو (B)، اللانشون (J, K, N, R, S) والهوت دوغ (L) مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها، بينما كانت عينات الروستو (C)، اللانشون (G, H, I, O, P, Q, T)

والهوت دوغ (M)، غير مطابقة لبطاقة البيان الخاصة بها من حيث وجود فول الصويا. أما عينات اللانشون (K, S, U) فكانت تحوي فول الصويا المعدل وراثياً من النوع RR.

- ✓ تعد تقنية PCR-RLFP رخيصة نسبياً ودقيقة وذات تكرارية ممتازة وهي حساسة وسريعة مما يؤهلها كتقنية هامة وعملية لتحديد هوية ومنشأ أنواع اللحوم المصنعة واستثمارها في الاختبارات الروتينية. فقد حُددت في هذه الدراسة هوية 14 نوع حيواني بتضخيم مورثة عامة الى جانب الهضم بخمسة أنزيمات تقطيع وبكفاءة عالية لكل من اللحوم الطازجة والمعاملة حرارياً والمصنعة.
- ✓ إن العائق الرئيسي لهذه الطريقة يتمثل في عجزها عن كشف نسبة الغش في خلائط اللحوم إذ لا يمكن تحديد نسب خلط أنواع اللحوم في خلائط اللحوم، كما أنها لا تستطيع هذه الطريقة التمييز بين جنس الحيوان (ذكر أو أنثى) لأن الدنا الميتوكوندري يورّث من قبل الأم حصراً وبالتالي هناك تطابق في تسلسل الدنا الميتوكوندري عند كل من الذكر والأنثى.
- ✓ ان الطريقة المستخدمة في هذه الدراسة (Duplex PCR لمورثة اللكتين ومورثة التعديل الوراثي من النوع RR) قادرة و بكفاءة عالية على الكشف عن فول الصويا في مصنعات اللحوم والتحري عن وجود المواد المعدلة وراثياً وهي طريقة سريعة وحساسة وذات تكلفة منخفضة نسبياً. كما أن طريقة برادفورد المطبقة في هذه الدراسة يمكنها التقدير الكمي للبروتينات الكلية المنحلة ومن ثم يمكننا التقدير التقريبي للبروتينات الحيوانية والنباتية الداخلة في خلطات التصنيع وهي طريقة سريعة ويمكن استخدامها للتحاليل الروتينية بشكل فعال.

5. التوصيات والمقترحات

- ✓ إن هذه الدراسة تعد من اوائل الدراسات التي تعنى بتحديد هوية أنواع اللحوم وتمييزها للكشف اللاحق عن الغش في اللحوم ومنتجاتها. وهي كذلك الدراسة الأولى في سوريا للتحري عن المواد المعدلة وراثياً. وبالتالي يمكن الاستفادة من نتائج هذه الدراسة في التطبيقات العملية.

- ✓ يمكن اقتراح تعديل المواصفة بحيث تلزم الشركات المصنعة بإدراج الاسم العلمي للنوع الحيواني المستخدم لتلافي الاستبدال الجزئي للحوم، وكذلك توضيح نسب خلط اللحوم والبروتينات النباتية بحيث لا تقل نسبة البروتين الحيواني (وليس البروتين العام) عن نسبة محددة، وضرورة الاشارة الى وجود فول الصويا كونه واحداً من مسببات الحساسية بشكل واضح وألّا تتجاوز كمية المواد المعدلة وراثياً عن 0.9% وفقاً لتشريعات الاتحاد الأوروبي.

6. المراجع References:

6-1- المراجع العربية:

عزيزية، عبد الحكيم .(1995). تصنيع منتجات الدواجن، **كتاب جامعي**، كلية الزراعة، منشورات جامعة دمشق.

م. ق. س. هيئة المواصفات والمقاييس السورية (2011). المواصفة الخاصة باللحم المفروم والناعم والمحفوظ والمعلب (لحم لانشون) – التعديل الثاني. المواصفة رقم (80) . وزارة الصناعة . سورية.

6-2- المراجع الأجنبية:

Abuzinadah, O. H., Yacoub, H. A., El Ashmaoui, H. M., & Ramadan, H. A. (2015). Molecular detection of adulteration in chicken products based on mitochondrial 12S rRNA gene. **Mitochondrial DNA**, 26(3), 337-340.

Aksoy, B. T., and Sönmezoglu, Ö. A. (2022). Comparison of modified DNA isolation methods for the detection of GMO in processed foods. **International Journal of Life Sciences and Biotechnology**, 5(3), 546-561.

Ali, M. E., Ahamad, M. N. U., Hossain, M. M., & Sultana, S. (2018). Multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay discriminates of rabbit, rat and squirrel meat in frankfurter products. Food Control, 84, 148-158.

Ali, M. E., Razzak, M. A., Abd Hamid, S. B., Rahman, M. M., Al Amin, M., & Abd Rashid, N. R. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. **Food chemistry**, 177, 214-224.

Al-Kahtani, H. A., Ismail, E. A., & Ahmed, M. A. (2017). Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques. **Food chemistry**, 219, 54-60.

Alshaikh, B., Sumainah, G., & Rahmo, A. (2015). Meat Species Identification using Molecular Methods. **Advances in Environmental Biology**, 5, 709-715.

Andree, S., K. Altmann, R. Binke and F. Schwagele, 2006. Animal species identification and quantification in meat and meat products by means of traditional and real-time PCR. Max Rubner-Institute, **Federal Research Institute of Nutrition and Food, Analysis Division, Kulmbach**, Germany.

Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., & Van Den Eede, G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, 214, 3-26.

Asensio, L., González, I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food control**, 19(1), 1-8.

Ashrafi-Dehkordi, E., Mazloomi, S. M., & Hemmati, F. (2021). A comparison of DNA extraction methods and PCR-based detection of GMO in textured soy protein. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, 16, 51-57.

Belloque, J., Garcia, M. C., Torre, M., & Marina, M. L. (2002). Analysis of soyabean proteins in meat products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 42(5), 507-532

Benbrook, C. M. (2012). Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the US--the first sixteen years. Environmental Sciences Europe, 24, 1-13.

Bhat, M. M., Salahuddin, M., Mantoo, I. A., Adil, S., Jalal, H., & Pal, M. A. (2016). Species-specific identification of adulteration in cooked mutton Rista (a Kashmiri Wazwan cuisine product) with beef and buffalo meat through multiplex polymerase chain reaction. **Veterinary world**, 9(3), 226.

Böhme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., & Ortea, I. (2019). Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics. **Journal of agricultural and food chemistry**, 67(14), 3854-3864.

Bonny, S. (2011). Herbicide-tolerant transgenic soybean over 15 years of cultivation: pesticide use, weed resistance, and some economic issues. The case of the USA. Sustainability, 3(9), 1302-1322.

Borges, B. J. P., Arantes, O. M. N., Fernandes, A. A. R., Broach, J. R., & Fernandes, P. M. B. (2018). Genetically modified labeling policies: Moving forward or backward?. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 6, 181.

Bottero, M. T., & Dalmasso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. **The Veterinary Journal**, 190(1), 34-38.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254.

Cahyadi, M., Barido, F. H., & Hertanto, B. S. (2018). Specific primer design of mitochondrial 12S rRNA for species identification in raw meats. In IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, 102 (1).

Cahyadi, M., Wibowo, T., Pramono, A., & Abdurrahman, Z. H. (2020). A novel multiplex-PCR assay to detect three non-halal meats contained in meatball using mitochondrial 12S rRNA gene. **Food Science of Animal Resources**, 40(4), 628.

Cascella, M., Bimonte, S., Barbieri, A., Del Vecchio, V., Caliendo, D., Schiavone, V., ... & Cuomo, A. (2018). Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge. **Infectious agents and cancer**, 13, 1-8

Cavin, C., Cottenet, G., Cooper, K. M., & Zbinden, P. (2018). Meat vulnerabilities to economic food adulteration require new analytical solutions. **Chimia**, 72(10), 697-697.

Chen, S. Y., Liu, Y. P., & Yao, Y. G. (2010). Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. **Journal of Genetics and Genomics**, 37(11), 763-769.

Chuah, L. O., He, X. B., Effarizah, M. E., Syahariza, Z. A., Shamila-Syuhada, A. K., & Rusul, G. (2016). Mislabelling of beef and poultry products sold in Malaysia. **Food Control**, 62, 157-164.

Cuhra, M. (2015). Review of GMO safety assessment studies: glyphosate residues in Roundup Ready crops is an ignored issue. Environmental Sciences Europe, 27, 1-14.

Dai, Z., Qiao, J., Yang, S., Hu, S., Zuo, J., Zhu, W., & Huang, C. (2015). Species authentication of common meat based on PCR analysis of the mitochondrial COI gene. **Applied biochemistry and biotechnology**, 176, 1770-1780.

Di Pinto, A., Forte, V., Guastadisegni, M. C., Martino, C., Schena, F. P., & Tantillo, G. (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. **Food control**, 18(1), 76-80.

Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D., & Brown, H. M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. **Meat science**, 68(3), 431-438.

Doosti, A., Ghasemi Dehkordi, P., & Rahimi, E. (2014). Molecular assay to fraud identification of meat products. **Journal of food science and technology**, 51, 148-152.

Du, Y., Chen, F., Bu, G., & Zhang, L. (2021). Distribution and degradation of DNA from non-genetically and genetically modified soybean (Roundup Ready): Impact of soybean protein concentrate and soybean protein isolate preparation. **Food Chemistry**, 335, 127582.

Elsanhoty, R. M. (2013). Genetically modified Roundup Ready soybean in processed meat products in the Kingdom of Saudi Arabia. **Annals of Agricultural Sciences**, 58(2), 231-237.

Espiñeira, M., Herrero, B., Vieites, J. M., & Santaclara, F. J. (2010). Validation of end-point and real-time PCR methods for the rapid detection of soy allergen in processed products. **Food Additives and Contaminants**, 27(4), 426-432.

European Commission. 2007. Directive 2007/68/EC amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC as regards certain food ingredients. Off J EU. L 310:11–14.

Everstine, K., Spink, J., & Kennedy, S. (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. **Journal of food protection**, 76(4), 723-735.

Fang, X., & Zhang, C. (2016). Detection of adulterated murine components in meat products by TaqMan© real-time PCR. **Food chemistry**, 192, 485-490.

Fekri, M., Khaniki, G. J., Pirhadi, M., & Abbassi, M. (2020). Assessment of total protein and soy protein contents in some heated meat products in Tehran, Iran. **Journal of Food Safety and Hygiene.**

Fiorino, G. M., Garino, C., Arlorio, M., Logrieco, A. F., Losito, I., & Monaci, L. (2018). Overview on untargeted methods to combat food frauds: a focus on fishery products. **Journal of food quality**, 2018.

Forte, V. T., Di Pinto, A., Martino, C., Tantillo, G. M., Grasso, G., & Schena, F. P. (2005). A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. **Food Control**, 16(6), 535-539.

Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., & Roosens, N. H. (2015). Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. **Biomed Res Int**, 2015, 1-22.

Fujimura, T., Matsumoto, T., Tanabe, S., & Morimatsu, F. (2008). Specific discrimination of chicken DNA from other poultry DNA in processed foods using the polymerase chain reaction. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 72(3), 909-913.

Galal-Khallaf, A. (2021). Multiplex PCR and 12S rRNA gene sequencing for detection of meat adulteration: A case study in the Egyptian markets. **Gene**, 764, 145062.

Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Borrell, Y. J., & Garcia-Vazquez, E. (2016). PCR-based assessment of shellfish traceability and sustainability in international Mediterranean seafood markets. **Food Chemistry**, 202, 302-308.

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 12SrRNA gene. **Meat Science**. 70:107-112.

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.

Gryson, N., Messens, K., & Dewettinck, K. (2004). Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84(11), 1357-1363.

Gürakan, G. C., & Aydin, G. (2011). Qualitative detection of GM maize (Bt11) in food and feed sold commercially in Turkey by PCR based methods.

Ha, J., Kim, S., Lee, J., Lee, S., Lee, H., Choi, Y., ... & Yoon, Y. (2017). Identification of pork adulteration in processed meat products using the developed mitochondrial DNA-based primers. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, 37(3), 464.

Hassab El-Nabi, S. E. S., Hussein, D., & Khallaf, A. G. (2021). Molecular detection of food fraud targeting mitochondrial 12S rRNA gene sequencing. **Journal of Bioscience and Applied Research**, 7(1), 17-22.

Hayes, M. (2020). Measuring protein content in food: An overview of methods. **Foods,** 9(10), 1340.

He, H., Wang, Y., Qing, Y., Li, D., Zhao, X., Zhu, Q., & Yin, H. (2018). Molecular authentication of meats from three terrestrial birds based on PCR-RFLP analysis of

the mitochondrial 12s rRNA gene. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 20, 651-656.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: **Biological Sciences**, 270(1512), 313-321.

Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J., & Jenkins, G. R. (2010). The use of 35S and T nos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 396, 2175-2187.

Hossain, M. M., Ali, M. E., Abd Hamid, S. B., Asing, Mustafa, S., Mohd Desa, M. N., & Zaidul, I. S. M. (2016). Double gene targeting multiplex polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay discriminates beef, buffalo, and pork substitution in frankfurter products. **Journal of agricultural and food chemistry**, 64(32), 6343-6354.

Hossain, M. M., Ali, M. E., Abd Hamid, S. B., Hossain, S. A., Nizar, N. N. A., Uddin, M. N., ... & Akanda, M. J. H. (2017). Tetraplex PCR assay involving double gene-sites discriminates beef and buffalo in Malaysian meat curry and burger products. **Food chemistry**, 224, 97-104.

Hou, B., Meng, X., Zhang, L., Guo, J., Li, S., & Jin, H. (2015). Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. **Meat science**, 101, 90-94.

Hsieh, Y. W., & Hwang, D. F. (2004). Molecular phylogenetic relationships of puffer fish inferred from partial sequences of cytochrome b gene and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, 52(13), 4159-4165.

Hübner, P., Studer, E., & Lüthy, J. (1999). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. **Food control**, 10(6), 353-358.

Islam, A., Halder, J., Rahman, A. M., Ud-Daula, A., Uddin, S., Hossain, M. K., ... & Alam, J. (2021). Meat origin differentiation by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **International Journal of Food Properties**, 24(1), 1022-1033.

Jansen, J. J. N., Kardinaal, A. F., Huijbers, G., Vlieg-Boerstra, B. J., Martens, B. P., & Ockhuizen, T. (1994). Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 93(2), 446-456.

Janssen, F. W., Voortman, G., & De Baaij, J. A. (1987). Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting, and immunoperoxidase staining. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 35(4), 563-567.

Keyvan, E., İPLİKÇİOĞLU, G. Ç., ÇINAR, B. K., BİLGEN, N., & ŞİRELİ, U. T. (2017). Identi-fication of meat species in different types of meat products by PCR. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 64(4), 261-266.

Khairil Mokhtar, N. F., El Sheikha, A. F., Azmi, N. I., & Mustafa, S. (2020). Potential authentication of various meat-based products using simple and efficient DNA extraction method. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 100(4), 1687-1693.

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 86(16), 6196-6200.

Kumar, A., Kumar, R. R., Sharma, B. D., Gokulakrishnan, P., Mendiratta, S. K., & Sharma, D. (2015). Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 55(10), 1340-1351.

Kumar, D., Singh, S. P., Karabasanavar, N. S., Singh, R., & Umapathi, V. (2014). Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cyt b gene. **Journal of food science and technology**, 51, 3458-3463

Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., ... & Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. **Planta**, 251(4), 91.

Kušec, I. D., Samac, D., Margeta, V., Radišić, Ž., Vincek, D., & Kušec, G. (2017). Efficiency of PCR-RFLP and Species-specific PCR for the Identification of Meat Origin in Dry Sausages. **Czech journal of food sciences**, 35(5).

Lakzadeh, L., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., & Fazeli, M. (2013). Application of PCR and SYBR green q rti-PCR assays for the identification and quantification of chicken meat under different cooking conditions. **Food Biotechnology**, 27(3), 249-260.

Li, J., Li, J., Xu, S., Xiong, S., Yang, J., Chen, X., ... & Zhou, T. (2019). A rapid and reliable multiplex PCR assay for simultaneous detection of fourteen animal species in two tubes. **Food chemistry**, 295, 395-402.

Li, T. T., Jalbani, Y. M., Zhang, G. L., Zhao, Z. Y., Wang, Z. Y., Zhao, X. Y., & Chen, A. L. (2019). Detection of goat meat adulteration by real-time PCR based on a reference primer. **Food chemistry**, 277, 554-557.

Li, Y. C., Liu, S. Y., Meng, F. B., Liu, D. Y., Zhang, Y., Wang, W., & Zhang, J. M. (2020). Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration. **Comprehensive Reviews in Food science and Food safety**, 19(4), 2256-2296.

Lin, H. Y., Chiueh, L. C., & Shih, D. C. (2000). Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. **Journal of Food and Drug Analysis**, 8(3), 8.

Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., & Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. **European Food Research and Technology**, 212, 497-504.

Mahajan. V, M., Y. P, G., V. D, D., R. D, K., & A. S, B. (2011). Molecular detection of meat animal species targeting MT 12S rRNA gene. **Meat Science**, 88(1), 23-27.

Mansouri, M., Khalilzadeh, B., Barzegari, A., Shoeibi, S., Isildak, S., Bargahi, N., ... & Rashidi, M. R. (2020). Design a highly specific sequence for electrochemical evaluation of meat adulteration in cooked sausages. **Biosensors and Bioelectronics**, 150, 111916.

Martinez, C., Baccou, J. C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J. F., Jalloul, A., ... & Nicole, M. (2000). Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of Xanthomonas campestris pv malvacearum. **Plant Physiology**, 122(3), 757-766.

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.

Meric, S. İ. N. A. N., ÇAKIR, O., TURGUT KARA, N., & Ari, Ş. (2014). Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples. **Genetics and Molecular Research**, (1)

Meyer, R., Chardonnens, F., Hübner, P., & Lüthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, 203, 339-344.

Milavec, M., Dobnik, D., Yang, L., Zhang, D., Gruden, K., & Žel, J. (2014). GMO quantification: valuable experience and insights for the future. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 406, 6485-6497.

Montegiove, N., Pellegrino, R. M., Emiliani, C., Pellegrino, A., & Leonardi, L. (2021). An Alternative Approach to Evaluate the Quality of Protein-Based Raw Materials for Dry Pet Food. **Animals**, 11(2), 458.

Morisset, D., Demšar, T., Gruden, K., Vojvoda, J., Štebih, D., & Žel, J. (2009). Detection of genetically modified organisms—closing the gaps. **Nature biotechnology**, 27(8), 700-701.

Moriuchi, R., Monma, K., Sagi, N., Uno, N., & Kamata, K. (2007). Applicability of quantitative PCR to soy processed foods containing Roundup Ready Soy. **Food Control**, 18(3), 191-195.

Murugaiah, C., Noor, Z. M., Mastakim, M., Bilung, L. M., Selamat, J., & Radu, S. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. **Meat science**, 83(1), 57-61.

Mutalib, S. A., Nazri, W. S. W., Shahimi, S., Yaakob, N., Sani, N. A., Abdullah, A., ... & Ghani, M. A. (2012). Comparison between pork and wild boar meat (Sus scrofa) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Sains Malaysiana**, 41(2), 199-204.

Naaum, A., Shehata, H., Chen, S., Li, J., Tabujara, N., Awmack, D., … Hanner, R. (2018). Complementary molecular methods detect undeclared species in sausage products at retail markets in Canada. **Food Control**, 84, 339–344.

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.

Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., & Murby, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. **Meat Science**, 54(4), 369-376.

Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G. (2019). The quality of DNA isolated from processed food and feed via different extraction procedures. **Molecules**, 24(6), 1188.

Qin, P., Qu, W., Xu, J., Qiao, D., Yao, L., Xue, F., & Chen, W. (2019). A sensitive multiplex PCR protocol for simultaneous detection of chicken, duck, and pork in beef samples. **Journal of food science and technology**, 56, 1266-1274.

Rashid, N. R. A., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Razzak, M. A., Asing, & Amin, M. A. (2015). A suitable method for the detection of a potential fraud of bringing macaque monkey meat into the food chain. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 32(7), 1013-1022.

Rott, M. E., Lawrence, T. S., Wall, E. M., & Green, M. J. (2004). Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(16), 5223-5232.

Safaei, P., Aghaee, E. M., Khaniki, G. J., Afshari, S. A. K., & Rezaie, S. (2019). A simple and accurate PCR method for detection of genetically modified rice. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, 17, 847-851.

Şakalar, E., Abasiyanik, M. F., Bektik, E., & Tayyrov, A. (2012). Effect of heat processing on DNA quantification of meat species. **Journal of food science**, 77(9), N40-N44.

Sambrook, J., Fritch, E. F. and T. Mantiatus, 1989. Molecular Cloning: **A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Habor Laboratory Press, New York**.

Schindler, S., Krings, U., Berger, R. G., & Orlien, V. (2010). Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated. **Meat Science**, 86(2), 317-323.

Shabani, H., Mehdizadeh, M., Mousavi, S. M., Dezfouli, E. A., Solgi, T., Khodaverdi, M., ... & Alebouyeh, M. (2015). Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. **Food chemistry**, 184, 203-206.

Sivaraman, B., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Alamelu, V., Wilwet, L., Aanand, S., & Sukumar, D. (2018). PCR-RFLP for authentication of different species of processed snappers using mitochondrial D-loop region by single enzyme. **Food Control**, 90, 58-65.

Slot, M. M., Van De Wiel, C. C. M., Kleter, G. A., Visser, R. G. F., & Kok, E. J. (2018). The assessment of field trials in GMO research around the world and their possible integration in field trials for variety registration. **Transgenic research**, 27, 321-329.

Soares, S., Mafra, I., Amaral, J. S., & Oliveira, M. B. P. (2010). A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. **International journal of food science & technology**, 45(12), 2581-2588.

Sönmezoglu, Ö. A., & Keskin, H. (2015). Determination of genetically modified corn and soy in processed food products. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, 3(3), 032-037.

Sreenivasan Tantuan, S., & Viljoen, C. D. (2021). Determining the presence of undeclared animal species using Real-time PCR in canned and ready-to-eat meat products in South Africa. **Journal of Food Science and Technology**, 58, 2699-2704.

Tahmasebi, A., Ashrafi-Dehkordi, E., Shahriari, A. G., Mazloomi, S. M., & Ebrahimie, E. (2019). Integrative meta-analysis of transcriptomic responses to abiotic stress in cotton. **Progress in biophysics and molecular biology**, 146, 112-122.

Taski-Ajdukovic, K., Nikolic, Z., Vujakovic, M., Milosevic, M., Ignjatov, M., & Petrovic, D. (2009). Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market. **Meat Science**, 81(1), 230-232.

Uddin, S. M. K., Hossain, M. M., Chowdhury, Z. Z., & Johan, M. R. (2021). Detection and dis-crimination of seven highly consumed meat species simultaneously in food products using heptaplex PCR-RFLP assay. **Journal of Food Composition and Analysis**, 100, 103938.

Wang, W., Liu, J., Zhang, Q., Zhou, X., & Liu, B. (2019). Multiplex PCR assay for identification and quantification of bovine and equine in minced meats using novel specific nuclear DNA sequences. **Food Control**, 105, 29-37.

Wu, J. H., Hong, P. Y., & Liu, W. T. (2009). Quantitative effects of position and type of single mismatch on single base primer extension. **Journal of microbiological methods**, 77(3), 267-275.

Wu, Y., Wang, Y., Li, J., Li, W., Zhang, L., Li, Y., ... & Wu, G. (2014). Development of a general method for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods. **Scientific reports**, 4(1), 7358.

Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C., & Willmund, R. (1999). Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. **Food control**, 10(6), 385-389.

Xia, Y., Chen, F., Du, Y., Liu, C., Bu, G., Xin, Y., & Liu, B. (2019). A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. **Bioscience reports**, 39(2), BSR20182271.

Xiang, W., Shang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Zhu, P., Huang, K., & Xu, W. (2017). Identification of a chicken (Gallus gallus) endogenous reference gene (Actb) and its application in meat adulteration. **Food Chemistry**, 234, 472-478.

Xing, B., Zhang, Z., Sun, R., Wang, Y., Lin, M., & Wang, C. (2020). Mini-DNA barcoding for the identification of commercial fish sold in the markets along the Taiwan Strait. **Food Control**, 112, 107143.

Xu, R., Wei, S., Zhou, G., Ren, J., Liu, Z., Tang, S., ... & Wu, X. (2018). Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat products. **Meat science**, 137, 41-46.

Yang, C., Zhong, G., Zhou, S., Guo, Y., Pan, D., Wang, S., ... & Cai, Z. (2022). Detection and characterization of meat adulteration in various types of meat products by using a high-efficiency multiplex polymerase chain reaction technique. **Frontiers in Nutrition**, 9, 979977.

Yang, Y. T., & Chen, B. (2016). Governing GMOs in the USA: science, law and public health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96(6), 1851-1855.

Zarkadas, M., Scott, F. W., Salminen, J., & Ham Pong, A. (1999). Common allergenic foods and their labelling in Canada—a review. **Can J Allergy Clin Immunol**, 4(3), 118-41.

Zhao, L., Hua, M. Z., Li, S., Liu, J., Zheng, W., & Lu, X. (2019). Identification of donkey meat in foods using species-specific PCR combined with lateral flow immunoassay. **RSC advances**, 9(46), 26552-26558.

Zheng, X., Li, Y., Wei, W., & Peng, Y. (2019). Detection of adulteration with duck meat in minced lamb meat by using visible near-infrared hyperspectral imaging. **Meat Science**, 149, 55–62.

الملحق (1): الإجراء المعد لاستخلاص الدنا من خلايا الدم

أُضيف 180 µl من المحلول الواقي PBS لحل الخلايا. أُضيف 20 µl من محلول بروتيناز K بتركيز 20 ملغ/مل ويُخلط لمدة 15 ثانية. وُضع الأنبوب في حمام جاف بدرجة حرارة 56˚م لمدة 2.5–3 ساعات (الحضن)، مع مراعاة الخلط كل نصف ساعة والتثفيل لمدة 5 ثوان لضمان تجميع محتويات الأنبوب في الأسفل. يُضاف 200 µl من المحلول الواقي AL ويُخلط لمدة 15 ثانية. وُضع الأنبوب في حمام جاف بدرجة حرارة 70˚م لمدة 10دقيقة ثم التثفيل لمدة 5 ثانية. أُضيف 200 µl من الإيثانول النقي المبرّد (+4 ºم) وخُلط لمدة 15 ثانية ثم يُثفّل لمدة 5 ثانية. نُقل كامل محتوى الأنبوب، أي السائل الطافي مع الدنا المترسب، على دفعتين إلى عمود الفصل وبدون ترطيب حواف الأنبوب للحد من التلوث الإعتراضي، ثم ثُفّل لمدة 1 دقيقة بسرعة 12000 دورة/الدقيقة، فيعلق الدنا المترسب على طبقة السليكا ويرمى السائل المتجمع في أنبوب الجمع. نُقل عمود الفصل إلى أنبوب جمع جديد وتم التخلص من أنبوب الجمع الأول. أُضيف 500 µl من المحلول الموقي AW1 إلى عمود الفصل وفي مركز العمود، وثُفّل العمود لمدة دقيقة واحدة بسرعة 12000 دورة/الدقيقة، بهدف غسل الدنا المترسب على طبقة السليكا وتنقيته من آثار البروتين، ثم نُقل العمود إلى أنبوب جمع جديد ويتم التخلص من أنبوب الجمع السابق. أُضيف 500 µl من المحلول المواقي AW2 إلى عمود الفصل وفي مركز العمود، ثم ثُفل لمدة ثلاث دقائق وبسرعة 12000 دورة/الدقيقة، ولنفس السبب السابق، ثم نُقل العمود إلى أنبوب جمع جديد وتم التخلص من أنبوب الجمع السابق. يُضاف 100 µl من PCR water إلى عمود الفصل وفي مركز العمود، ثم الإنتظار لمدة خمس دقائق وبدرجة حرارة الغرفة، للسماح للدنا المترسب على طبقة السيليكا بالتحرر ثم التثفيل لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 12000 دورة/الدقيقة، نُقل السائل المتجمع في الأنبوب إلى أنبوب إبندورف جديد عليه لصاقة تدل على اسم العينة، تاريخ عزل الدنا، الحصاد الأول (PCR water الحاوي على الدنا المعزول والمنحل الناتج عن مرحلة الغسيل الأولى). أُعيد إضافة 100 µl من PCR water إلى عمود الفصل والخطوات اللاحقة، مع الإشارة إلى الحصاد الثاني (PCR water الحاوي على الدنا المعزول والمنحل

الناتج عن مرحلة الغسيل الثانية). أُخذت كمية من الحصاد الأول والثاني من أجل اختبارات التقدير النوعي الدنا المعزول الموضحة لاحقاً وحُفظ العينات بدرجة حرارة −20˚م لإجراء اختبار الـ PCR لاحقاً.

الملحق (2): الإجراء المعد لاستخلاص الدنا من الأنسجة

طُحنت عينة اللحم باستخدام الآزوت السائل لتصبح بشكل مسحوق ناعم، ثم أُخذت عينة بوزن 50 ملغ ووُضعت في أنبوب ابندورف معقم. أُضيف 80 µl من المحلول الموقي BPS الخاص بعزل الدنا، ثم أُضيف 100 µl من المحلول الموقي ATL وخُلط لمدة 15 ثانية. يُضاف 30 µl من محلول بروتيناز K بتركيز 40 ملغ/مل ثم خُلط لمدة 15 ثانية. وُضع الأنبوب في حمام جاف بدرجة حرارة 56˚م حتى اليوم التالي، مع مراعاة الخلط كل نصف ساعة. نُقّل الأنبوب لمدة 5 ثوان لضمان تجميع محتوياته في الأسفل أُضيف 400 µl من المحلول الموقي AL وخُلط لمدة 15 ثانية. وُضع الأنبوب في حمام جاف بدرجة حرارة 70 ˚م لمدة 10 دقيقة ويُثقل لمدة 5 ثوان. أُضيف 400 µl من الإيتانول النقي وخُلط لمدة 15 ثانية ثم ثُفل لمدة 5 ثوان. نُقل كامل محتوى الأنبوب، أي السائل الطافي مع الدنا المترسب، على دفعتين إلى عمود الفصل وبدون ترطيب حواف الأنبوب للحد من التلوث الاعتراضي، ثم ثُفل لمدة 1 دقيقة وبسرعة 12000 دورة/الدقيقة، فيعلق الدنا المترسب على طبقة السليكا ويتم التخلص من السائل المتجمع في أنبوب الجمع. نُقل العمود إلى أنبوب جمع جديد ويتم التخلص من أنبوب الجمع الأول. أُضيف 500 µl من المحلول الموقي AW1 إلى عمود الفصل وفي مركز العمود، وثُفل لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 12000 دورة/الدقيقة، بهدف غسل الدنا المترسب على طبقة السليكا وتنقيته من آثار البروتين، ثم نُقل العمود إلى أنبوب جمع جديد ويتم التخلص من أنبوب الجمع السابق. أُضيف 500 µl من المحلول الموقي AW2 إلى عمود الفصل وفي مركز العمود، ثم ثُفل لمدة ثلاث دقائق وبسرعة 12000 دورة/الدقيقة، ولنفس السبب السابق، ثم نُقل العمود إلى أنبوب جمع جديد ويتم التخلص من أنبوب الجمع السابق. أُضيف 100 µl من PCR water إلى عمود الفصل وفي مركز العمود، مع الإنتظار لمدة خمس دقائق وبدرجة حرارة الغرفة، للسماح للدنا المترسب على طبقة السيليكا بالتحرر، ثم التثفيل لمدة دقيقة واحدة بسرعة 12000 دورة/الدقيقة، نُقل السائل المتجمع في الأنبوب إلى أنبوب إبندورف جديد عليه لصاقة تدل على اسم العينة، تاريخ

عزل الدنا، الحصاد الأول. أُعيدت خطوة إضافة 100 µl من PCR water إلى عمود الفصل كاملة، مع الإشارة إلى الحصاد الثاني. أُخذت كمية من الحصاد الأول والثاني من أجل اختبارات التقدير النوعي للدنا المعزول الموضحة لاحقاً. حُفظت العينات بدرجة حرارة −20°م لاجراء اختبار PCR فيما بعد.

الملحق (3): الإجراء المعد لاستخلاص الدنا من الأنسجة النباتية

أُخذ عينة من مسحوق فول الصويا غير المعدل وراثياً، وفول الصويا المعدل وراثياً بنسبة 10%، بوزن 50 ملغ ووُضعت في أنبوب ابندورف معقم. أُضيف 600 µl من المحلول الموقي NLS لتفكيك الخلايا ويُخلط لمدة 3 ثوان. حُضّن الأنبوب على درجة حرارة 65° م لمدة 15 دقيقة وأُضيف 3 µl من المحلول الموقي RNase للتخلص من الـ RNA، وخُلطت محتويات الأنبوب بالتقليب اللطيف 2−5 مرات، ثم حُضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 15 دقيقة والانتظار 5 دقائق حتى تصبح العينة بدرجة حرارة الغرفة. أُضيف 200 µl من محلول ترسيب البروتينات وخُلط الأنبوب بقوة لمدة 20 ثانية. يُثقّل الأنبوب لمدة 3 دقائق بسرعة 13000−16000 دورة/الدقيقة، ليتشكل رسابة من البروتينات المترسبة أسفله. نُقل الطافي المحتوي على الدنا بحذر لأنبوب ابندورف جديد يحتوي على 600 µl آيزوبروبانول بدرجة حرارة الغرفة. خُلط الأنبوب بالتقليب اللطيف حتى تتشكل خيوط الدنا بشكل واضح. ثُقّل الأنبوب لمدة 1 دقيقة بسرعة 13000−16000 دورة/الدقيقة، وبدرجة حرارة الغرفة. نُقل الطافي بحذر الى أنبوب جديد ثم أُضيف 600 µl من الايتانول بتركيز 70% وبدرجة حرارة الغرفة، وخُلطت محتويات الأنبوب بالتقليب اللطيف عدة مرات لضمان غسل الدنا. ثم ثُفل لمدة 1 دقيقة بسرعة 13000−16000 دورة/الدقيقة، وبدرجة حرارة الغرفة. سُحب الايتانول الطافي بحذر شديد دون الاضرار برسابة الدنا أسفل الانبوب. وقُلب الأنبوب رأساً على عقب على ورق نشاف نظيف لتنشيف رسابة الدنا لمدة 15 دقيقة. أُضيف 100 µl محلول حل الدنا وحُضن بدرجة حرارة 65 °م لمدة ساعة مع خلط محتويات الأنبوب بالنقر الخفيف عدة مرات، أو يُحضن المحلول طوال الليل بدرجة حرارة 4 °م. حُفظ الدنا بدرجة حرارة 2−8 °م للاستخدام اللاحق.

Abstract:

This research aimed to identify meat species source in commercially processed meats in the local Syrian markets, to evaluate the conformity with the actual ingredients and the stated food labels by applying PCR-RFLP technique, and also, to detect the presence of soybean and genetically modified organisms by utilizing PCR techniques.

Twenty-five samples of processed meat products (luncheon, pastrami, salami, rosto, hotdog, sausage, kebab and shaqf), were randomly collected in 2018. The research was conducted in the National Commission for Biotechnology and the Faculty of Agricultural Engineering laboratories.

Meat species sources of the studied samples were identified by amplifying a segment of mt12SrRNA using universal primers, the amplified products were digested by applying five restriction enzymes of type II: *ApoI, AluI, HhaI, MspI & BspTI*. The restriction patterns of the samples were compared with restriction patterns of reference samples served as positive controls. The presence of soybean in meat products was verified by amplifying the lectin gene, soy-specific gene. It was determined whether the soybean in positive samples was genetically modified or not by targeting the regulatory sequences from transgenic organisms (35S promoter, NOS terminator). Then, the existence of the plant pesticide resistance gene, was investigated by amplifying CaMVi35S promoter, presents in genetically modified soybeans of the Roundup Ready Soybean (RR) type. Total soluble proteins were also estimated.

The results showed that seventeen samples were identical to their respective food labels, while eight samples were not identical to their respective food labels in terms of meat species sources. Eleven samples were positive for the lectin gene and were identical to their respective food labels, and four samples were negative for the lectin gene and were not identical to their respective food labels in terms of soybean presence. Also, ten samples contained genetically modified organisms, three of them contained RR soybeans. The results demonstrated that total soluble proteins in most samples were between (1-1.3 mg/g), which means that these samples contain good amount of meat and/or vegetable proteins. While total soluble proteins in three

samples were between (0.2-0.9 mg/g), which means that these samples contain minimal amount of meat and vegetable proteins.

PCR-RFLP technique has been, therefore, demonstrated to be a sensitive, highly reproducible, and comparatively less costly technique for meat source identification. Targeting the lectin gene and CaMVi35S promoter together by duplex PCR can detect genetically modified soybeans for pesticide resistance efficiently, saving time and cost.

Keywords: Processed meat products, Food label, PCR-RFLP, Soybean, Genetically Modified Organisms, Duplex PCR, Protein.

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agricultural Engineering
Dep. of Food Science

Quantitive and Qualitive Molecular Detection for Plant and Animal Proteins Used in Processed Meat in Syrian Markets

Thesis submitted for obtaining a PhD degree in Agricultural Engineering

(Food Science)

By

Banan Ahmad Basheer Alshaikh

Supervisore
Prof. Abdul Hakim Azizieh
Faculty of Agriculture Engineering
Dep. of Food Science

Co-supervisore
Prof. Essam Kasem
Faculty of Science
Dep. of Zoology

2024