

مقاله پژوهشی

## بررسی تایید وجود DNA تاس ماهیان در محصولات زیبایی با استفاده از روش بارکدینگ ژن‌های میتوکندریایی

شیرین جمشیدی<sup>۱\*</sup>، محمد حسن زاده صابر<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: تیر ۹۹

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۹

### چکیده

به منظور بررسی وجود یا عدم وجود DNA در نمونه کرم و عصاره خاویار، چهار نمونه کرم و یک نمونه عصاره خاویار با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز ارزیابی شدند. میزان DNA استخراج شده در نمونه‌های کرم و عصاره خاویار بر اساس سنجش با نانودراپ برابر با ۵ تا ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر بود، ولی بررسی این نمونه‌ها به جهت غلظت کم، روی ژل امکان‌پذیر نشد. به منظور آزمون وجود یا عدم وجود DNA در عصاره و کرم خاویار در کرم آرایشی از روش ردیابی DNA میتوکندریایی گونه‌های تاس ماهیان و با استفاده از تکثیر قطعات پراهمیت در آزمون‌های بارکدینگ (Barcoding) جهانی مثل قطعه سیتوکروم اکسیداز I (COI) و سیتوکروم اکسیداز b (Cyt b) استفاده شد. قطعات تکثیر شده در کرم‌ها و عصاره خاویار مورد آنالیز توالی‌یابی قرار گرفتند که طول قطعه در ژن COI برابر ۶۵۰ نوکلئوتید و در Cyt b برابر ۱۲۰۰ نوکلئوتید بود. نتایج نهایی نشان داد نمونه‌های کرم و عصاره، حاوی DNA تاس ماهیان بود و گونه تاس ماهی که از آن برای تهیه کرم استفاده شده بود به گونه تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*) نزدیک‌تر بود.

**واژگان کلیدی:** کرم خاویار، عصاره خاویار، ژن COI، ژن Cyt b، بارکدینگ.

۱- استادیار بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

۲- مربی بخش ژنتیک و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

\* نویسنده مسئول: [jamshidi99@yahoo.com](mailto:jamshidi99@yahoo.com)

## مقدمه

دارد که خاویار در بازارهای بین‌المللی از ۸ گونه ماهی چالباش *Acipenser gueldenstaedtii* ازون‌برون *A. stellatus*، تاس‌ماهی سفید *A. transmontanus*، تاس‌ماهی سیبری *A. baerii*، فیل‌ماهی *Huso huso*، *Eumicrotremus*، *Cyclopterus lumpus* و *Mallotus villosus orbis* تولید می‌شود که سه گونه آخر جز تاس‌ماهیان نیستند و محصول خاویار تولید شده از تخم این ماهیان تقلبی است (Bronzi et al., 2011; Pappalardo and Ferrito, 2019). خاویار یک ماده غذایی لذیذ و پراهمیت است که نسبت به تخم دیگر ماهیان، ضریب هضمی و جذبی بالایی دارد و درصد بالایی از پروتئین، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب غیراشباع در آن وجود دارد که از جمله مواد مغذی مورد نیاز بدن انسان برای رشد، ترمیم و مقاومت در برابر بیماری‌ها هستند. وضعیت ویتامین‌های محلول در چربی (A، D و E) و محلول در آب (ویتامین‌های گروه B) و مواد معدنی مثل ید و فسفر خاویار هم در وضعیت مناسبی قرار دارد (بهمنی، ۱۳۸۵؛ مرادی، ۱۳۸۷). علاوه بر استفاده خاویار در تغذیه انسان، از این محصول برای تهیه کرم‌های آرایشی و بهداشتی با کیفیت بالا در بسیاری از

شناسایی محصولات تهیه شده از گوشت ماهیان خاویاری و خاویار ماهی از چالش‌های بسیار مهم در تجارت این محصولات است. بر اساس اطلاعات مجمع بین‌المللی تجاری گونه‌های در معرض خطر انقراض (Convention on International Trade in Endangered Species: CITES) تمامی گونه‌های خانواده تاس‌ماهیان (Acipenseridae) جز گونه‌های حفاظت شده هستند و در رده‌بندی تعریف شده جز فهرست جانوران در معرض خطر (Endangered) قرار دارند (Raymakers, 2006). بر اساس تعاریف محصولات تجاری، واژه «خاویار» فقط به تخمک تاس‌ماهیان گفته می‌شود و این عنوان بر روی محصولات تولید شده از خاویار با نام عمومی که برای هر گونه تاس‌ماهی به کار می‌رود، باید درج شود. اما امروزه از تخمک‌های دیگر ماهیان غیر از تخمک تاس‌ماهیان خاویار تهیه می‌شود که به شکلی جایگزین خاویار آن‌ها می‌شود و طعم آن شباهت زیادی با تخم تاس‌ماهیان دارد. از نظر قیمت، محصولات تقلبی قیمت کمتری دارند (Bronzi and Rosenthal, 2014)، در صورتی که قیمت خاویار تاس‌ماهیان با توجه به کاهش ذخایر آن‌ها بسیار بالا است. گزارش‌هایی وجود

گوشت ماهی آزاد و بسیاری دیگر از گونه‌های ماهیان، امکان‌پذیر است. با گرفتن اطلاعات طبقه‌بندی آبیان که برای ماهی و غذاهای دریایی در پایگاه FISH-BOL (<http://www.fishbol.org>) و همچنین برای ماهیان دریایی در پایگاه MarBOL (<http://www.marinebarcoding.org>) موجود است، می‌توان اطلاعات جامعی را برای شناسایی هر گونه به دست آورد. در سال ۱۹۹۹ Wolf و همکاران با استفاده از تکنیک PCR-RFLP تعداد ۱۰ گونه از ۲۱ نمونه خاویار موجود در بازار سوئیس را شناسایی کردند. در سال ۲۰۰۲، Ludwig و همکاران توانستند تعداد ۱۷ گونه از ۲۲ گونه موجود در بازار آلمان را شناسایی کنند. کلنگی میاندره و همکاران در سال ۱۳۹۱ با استفاده از توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز *b* (*Cyt b*) تفاوت گونه‌های ازون‌برون، فیل‌ماهی و شیپ (*A. nudiventris*) را از هم تفکیک کردند. اما گونه‌های تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و چالباش هر دو توالی یکسانی داشتند و قابل تشخیص از هم نبودند. پژوهش حاضر بر اساس درخواست شرکت آریین زیست جم، تولید کننده کرم آرایشی ساخته شده از عصاره خاویار، مبنی بر آزمون وجود یا عدم وجود DNA ماهی خاویار در

محصولات آرایشی و بهداشتی دنیا استفاده می‌شود. برای تایید صحت این محصولات، بهترین راه پیشنهادی، استفاده از روش شناسایی ژنتیک قانونی (Forensic Genetic Identification) است که در پزشکی قانونی برای شناسایی موجودات به کار می‌رود. برای شناسایی و ردیابی در تشخیص جانوران، از توالی بارکدینگ ژن که ژن میتوکندریایی *COI* است، استفاده می‌شود (Dawnay et al., 2007). در بسیاری از کشورهایی که از سوشی استفاده می‌کنند، فروش تقلبی گوشت تیلاپپای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) به جای گوشت ماهی تن سفید (*Thunnus albacares*) یا گوشت ماهی باس سفید (*Morone chrysops*) به جای باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) مرسوم است. همچنین حدود ۷ تا ۹ گونه ماهی هستند که ممکن است تقلبی به جای گوشت ماهی سرخو معمولی (*Lutjanus johnii*) که با کیفیت و گران قیمت است، فروخته شوند (Marko et al., 2004; Wong and Hanner, 2008). امروزه با فن‌آوری‌های جدید زیستی مثل بررسی ژن‌هایی که در شناسایی گونه (Species Diagnostic) نقش دارند، ردیابی و صحت‌گذاری روی محصولات ارزشمندی که از خاویار یا

رسید و در صورت موجود بودن از این روش به عنوان روش تشخیصی (Barcoding) کمک گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### استخراج DNA

محتویات ژنتیکی کرم خاویار، عصاره خاویار، بافت باله تاسماهی ایرانی و DNA انسانی مورد استخراج قرار گرفت. به این منظور تعداد ۴ عدد کرم خاویار و یک عدد عصاره خاویار با ۳ تکرار در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای استخراج DNA موجود در کرم و عصاره خاویار از فیلترهای ویژه (DNeasy PowerClean, Qiagen, Pro Cleanup Kit, آلمان) استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر کرم خاویار و عصاره خاویار در یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد. مقدار ۱۸۰ میکرولیتر بافر لیز کننده، ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/mL) به نمونه داخل لوله اضافه شد. محتوی داخل لوله‌ها در ترمومیکسر (Eppendorf, Vapo Protect, آلمان) با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۳ ساعت انکوبه شدند تا از داخل سلول به بیرون ریخته شوند و به صورت امولسیون غلیظ در بیابند. در انتها الکل ۲- پروپانل به میزان ۲۰۰ میکرولیتر با امولسیون به دست آمده

نمونه‌های عصاره و کرم خاویار (Caviar Cream and Caviar Extract) این شرکت، انجام شد. آزمون استخراج DNA وجود یا عدم وجود آن را در نمونه عصاره و کرم تایید می‌کند، منتها چون ارزیابی کمی و کیفی هر دو شرط لازم برای تایید وجود DNA است و از طرف دیگر، میزان DNA در عصاره و کرم خاویار بسیار اندک است و روش بررسی روی ژل (روش کیفی) در این پژوهش نتوانست وجود DNA را نشان دهد، از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای اثبات تکمیلی وجود DNA استفاده شد. چون واکنش PCR قابلیت کمی کردن ژن را دارد و با بررسی قطعات به دست آمده از نظر توالی ژن و مقایسه با بانک ژنی می‌توان به وجود یا عدم وجود DNA در کرم و عصاره خاویار مهر تایید گذاشت. همچنین برای تایید بهتر در کنار ژن *COI* از توالی ژن *Cyt b* تاس‌ماهیان هم برای تکمیل شناسایی استفاده شد. زیرا ژن *Cyt b* بیشتر برای تشخیص گونه در جانوران کاربرد دارد. فرضیه پژوهش حاضر این بوده است که آیا توالی این دو ژن تکثیر شده از DNA موجود در کرم و عصاره خاویار می‌تواند نشان دهنده قسمتی از ژنوم تاس‌ماهیان باشد تا بتوان به هدف تایید وجود یا عدم وجود DNA تاس‌ماهیان در محصول آرایشی- بهداشتی

برای استخراج DNA انسانی از بافت پوست دست انسان استفاده شد و بقیه فرآیند استخراج کاملاً مانند استخراج DNA از بافت باله ماهی بود.

**ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده**  
 DNA استخراج شده از بافت باله تاس ماهی ایرانی و بافت انسانی روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. چون میزان DNA استخراج شده از عصاره و کرم خاویار بسیار اندک بود، DNA استخراج شده روی ژل قابل بررسی نبود.

برای تعیین کمیت DNA استخراج شده از روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo، ND-1000، امریکا) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. پس از کالیبره کردن دستگاه نانودراپ با بافر رقیق کننده مثل آب مقطر، میزان DNA موجود در آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر حسب نانوگرم در میکرولیتر اندازه‌گیری شد. میزان غلظت و خلوص DNAهای استخراج شده از عصاره و کرم خاویار، باله تاس ماهی ایرانی و پوست انسان نیز توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد. میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر

مخلوط شد. محلول به دست آمده از روی ستون کیت استخراج DNA (Qiagen، آلمان) عبور داده شد و هر دفعه به میزان ۴۰۰ میکرولیتر از محلول در دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf، 5415D، آلمان) شد تا کل محلول به دست آمده از روی فیلتر عبور داده شود. چون میزان DNA عصاره و کرم خاویار برای انجام واکنش زنجیره پلیمرز کم بود، این فرآیند چندین بار تکرار شد تا غلظت مناسب برای PCR بر روی یک فیلتر به دست آمد. بقیه مراحل استخراج DNA توسط کیت به صورت مشابه اجرا شد. در انتها تمامی DNA در حجم ۲۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده (Elution Buffer) حل شد و برای مراحل بعدی در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای استخراج بافت، مقدار ۱۰ میلی‌گرم از باله سینه‌ای تاس ماهی ایرانی برداشته شد و در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد. برای انجام آزمایش، ابتدا الکل تثبیت کننده خارج شد. پس از الکل‌زدایی، نمونه داخل هاون چینی با ریختن نیتروژن مایع کوبیده شد و به شکل خمیر در آمد و بعد میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (DNeasy Blood and Tissue Kits، Qiagen، آلمان) به آن افزوده شد.

اضافه شد. برای PCR نمونه‌های کرم و عصاره خاویار که DNA اندکی داشتند از غلظت ۵ تا ۲۰ نانوگرم DNA استفاده شد و برای نمونه‌های انسانی و بافت تاس‌ماهی ایرانی از غلظت ۱۰۰ نانوگرم DNA استفاده شد. ویال‌های حاوی مواد مخلوط شده با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند تا مواد داخل آن به صورت یکنواخت و بدون حباب در ته لوله جای گیرند و پس از آن لوله‌ها برای اعمال چرخه‌های حرارتی داخل دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آمریکا) قرار داده شدند. چون آغازگرها برای اولین بار استفاده می‌شدند دمای الحاق (Annealing) به شکل گرادینت قرار داده شد تا بهترین دمای الحاق به دست آید. برنامه حرارتی شامل واسرشته‌سازی اولیه (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۸ چرخه برای کرم و عصاره خاویار و ۳۵ چرخه برای بافت تاس‌ماهی ایرانی و بافت انسانی به صورت واسرشته‌سازی ۳۰ ثانیه، الحاق در ۶۲-۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط (Extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به میزان ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه برای ژن سیتوکروم اکسیداز *b* و ۴۵ ثانیه برای ژن *COI* بود.

(غلظت DNA) و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین شد.

#### انتخاب آغازگر برای ژن‌های *COI* و سیتوکروم اکسیداز *b* و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

از ژن *COI* به عنوان ژن «پذیرفته شده جهانی» برای تعیین گونه استفاده شد (Ward et al., 2005). اما برای نتیجه‌گیری‌های تکمیلی از ژن سیتوکروم اکسیداز *b* (*Cyt b*) هم برای تعیین گونه استفاده شد (Xiao et al., 2001). مشخصات آغازگرهای به کار رفته در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

برای انجام PCR، ابتدا داخل لوله ۱/۵ میلی‌لیتری استریل شده تمام مواد (به جز DNA) بر حسب تعداد نمونه محاسبه و درون لوله ریخته شد و محتویات آن با دستگاه همزن برقی (ورتکس، ندای فن، ایران) مخلوط شد. بر این اساس برای هر واکنش ۱/۲۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X PCR (سیناژن، ایران)، ۰/۲۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> ۵۰ میلی‌مولار (سیناژن، ایران)، ۱۰ پیکومول برای هر جفت آغازگر، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن) ۵ واحد در میکرولیتر،

جدول ۱: آغازگرهای به کار گرفته شده برای ژن‌های *COI* و *Cyt b*

ژن تکثیر شده	طول تقریبی قطعه تکثیر شده (bp)	توالی آغازگرها از ۵' به ۳'
<i>COI</i>	۶۵۰	F:TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC R:TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
<i>Cyt b</i>	۱۲۰۰	F:GACTTGAAAAACCACCGTTG R:CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC

اسپیسر دو طرف سینی برداشته شد و ژل به آرامی داخل تانک الکتروفورز قرار گرفت. مقدار ۲ میکرولیتر از محصول PCR همراه با دو میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملاً مخلوط و با دقت به هر یک از چاهک‌های ژل ریخته شد. تانک الکتروفورز به منبع جریان برق متصل و دستگاه مولد برق بر روی ۱۰۰ ولت تنظیم شد. پس از رسیدن بافر سنگین کننده به انتهای ژل مورد نظر بر روی دستگاه UV ترانس ایلومیناتور (Vilber Lourmat، آلمان) منتقل شد و کیفیت محصول PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

استخراج محصولات PCR از روی ژل آگارز محصولات PCR برای ژن میتوکندریایی *COI* به روی ژل برده شد، برش زده شد، با استفاده از کیت استخراج ژن از ژل آگارز (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit، آلمان) محصولات PCR از روی ژل بریده شد و خالص‌سازی صورت پذیرفت. روش خالص‌سازی

بسط نهایی نیز ۵ دقیقه بود. در نهایت بهترین دمای الحاق ۵۹ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد چون بالاترین میزان تکثیر روی ژل را نشان داد.

#### ارزیابی کیفیت محصول PCR

با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، محصولات PCR از روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور، برای تهیه ژل ۱ درصد آگارز، ۸۰ میلی‌لیتر بافر ۰/۵X از TBE (حاوی تریس، بوریک اسید و EDTA با pH ۸) درست شد، ۰/۸ گرم پودر آگارز به آن اضافه شد و روی حرارت قرار داده شد تا آگارز در محلول حل و بی‌رنگ شود. زمانی که دمای محلول به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید، ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۱ درصد به آن اضافه و محلول کاملاً به هم زده شد. سپس محلول روی سینی ژل ریخته شد و شانه داخل ژل قرار داده شد. پس از سرد شدن ژل، شانه از ژل بیرون آورده شد تا چاهک‌ها ایجاد شوند. پس از بستن ژل

کاملاً بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده کیت استخراج بود. با توجه به این که میزان غلظت نهایی باید بیش از ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر باشد تا برای خدمات تعیین توالی به *Macrogene* کره جنوبی فرستاده شود، نمونه‌های محصولات PCR عصاره و کرم خاویار برای رسیدن به غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر در حجم بالا از استخراج DNA (معادل ۳ حجم) قرار داده شدند. خوانش از یک سمت (آغازگر F) برای ژن میتوکندریایی *COI* برای تمامی نمونه‌ها با سه تکرار انجام شد.

**رسم درخت فیلوژنی ژن *COI***

برای آزمودن متعلق بودن کرم و عصاره محصول آرایشی به خاویار خانواده *Acipenseridae*، توالی‌های ژنی به دست آمده برای ژن *COI* از کرم و عصاره خاویار به منظور بررسی دقیق قرابت خویشاوندی با دیگر تاس‌ماهیان با استفاده از نرم‌افزار *Mega X* (Kumar et al., 2018) و نرم‌افزار *Chromas 2.6* مورد تحلیل قرار گرفتند. به طور مختصر، ابتدا منطقه ژنی مورد نظر در تاس‌ماهیان و سه گونه از ماهیانی که در تقلب خاویار استفاده می‌شوند (جدول ۲) با استفاده از قابلیت همسانه‌سازی نرم‌افزار *Clustal X*، یکسان شدند و با استفاده از رسم دندوگرام (*Neighbor Joining (NJ)*) بر اساس مدل فاصله کیمورا ۲ (*K2P Distance*) ارتباط فیلوژنی محصولاتی که ادعا شده است با خاویار تاس‌ماهیان تولید شده‌اند، با بررسی درخت فیلوژنی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه بقیه توالی‌های استفاده شده در رسم دندوگرام از بانک ژنی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) به دست آمد. سه گونه که از آن‌ها خاویار تقلبی تهیه می‌شد به جهت این که از خانواده تاس‌ماهیان نبودند، به عنوان برون گروه (*Outgroup*) استفاده شدند (Pappalardo et al., 2015).



جدول ۲: اسامی علمی و شماره دسترسی بانک ژنی گونه‌های به کار گرفته شده در رسم درخت فیلوژنی برای تعیین قرابت فیلوژنی. نام‌های ماهیانی که از آن‌ها خاویار تقلبی تولید می‌شود به صورت پررنگ نشان داده شده است.

شماره دسترسی بانک ژنی	شماره دسترسی بانک ژنی	نام گونه ماهی
برای ژن <i>Cyt b</i>	برای ژن <i>COI</i>	
EU492084.1	MG421634.1	<i>Cyclopterus lumpus</i>
-	MK903718.1	<i>Eumicrotremus orbis</i>
NC_015244.1	NC_015244.1	<i>Mallotus villosus</i>
AY442351.1	AY442351.1	<i>Huso huso</i>
FJ392605.1	FY392605.1	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
MK213065.1	MK213065.1	<i>Acipenser persicus</i>
JQ045341.1	NC_017603.1	<i>Acipenser baerii</i>
NC_017603.1	KF153104.1	<i>Acipenser ruthenus</i>
AJ585050.1	AJ585050.1	<i>Acipenser stellatus</i>
KP997217.1	KP997217.1	<i>Acipenser oxyrinchus</i>
KP997217.1	KJ402277.1	<i>Huso dauricus</i>
KC905169.1	KC905169.1	<i>Acipenser schrenckii</i>
KP997216.1	KP997216.1	<i>Acipenser sturio</i>
KU321568.1	KU321568.1	<i>Acipenser nudiventris</i>
KM591217.1	KM591217.1	<i>Acipenser medirostris</i>
KU985083.2	KU985083.2	<i>Acipenser fulvescens</i>
MF101785.1	MF101785.1	<i>Scaphirhynchus albus</i>
MF101784.1	MF101784.1	<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>
KM591217.1	KM591217.1	<i>Acipenser mikadoi</i>
KX817311.2	KX817311.2	<i>Acipenser brevirostrum</i>

برای ژن *Cyt b* گونه *Eumicrotremus orbis* توالی ثبت شده در بانک ژن موجود نبود.

## نتایج

مشاهده نبود و تمامی DNA استخراج شده

چون میزان DNA استخراج شده از عصاره و کرم خاویار خیلی کم (بین ۵ تا ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود، DNA استخراج شده روی ژل برده نشد، چون در میزان کم روی ژل قابل مشاهده نبود و تمامی DNA استخراج شده

برای PCR استفاده شد. میزان DNA استخراج شده بافت باله تاس ماهی ایرانی ۳۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. میزان DNA ژنوم انسانی ۲۶۰ نانوگرم در میکرولیتر بود.

اتصال ندارد، بنابراین در شکل ۲ دیده می‌شود که طی PCR هیچ قطعه‌ای در انسان تکثیر نشد. به جهت منفی بودن تکثیر در لوله شاهد منفی نشان داد که کرم و عصاره خاویار حاوی DNA بودند. بهترین دمای الحاق نیز ۵۹ درجه سانتی‌گراد بود.

ژن *Cyt b* قطعه‌ای به اندازه تقریباً ۱۲۰۰ نوکلئوتیدی را تکثیر کرد. در شکل ۳ دیده می‌شود که PCR قطعه‌ای را در انسان تکثیر کرد، اما پروفایل تکثیر در انسان و ماهی متفاوت بود. به طوری که در انسان علاوه بر باند ۱۲۰۰، دو باند دیگر در محدوده ۱۵۰۰ و ۷۵۰ نوکلئوتیدی دیده شد. در حالی که در تاس‌ماهی ایرانی و کرم و عصاره خاویار فقط باند ۱۲۰۰ نوکلئوتیدی میتوکندیایی تکثیر شد و به جهت منفی بودن تکثیر در لوله شاهد منفی نشان داد که کرم و عصاره خاویار حاوی DNA بودند.

#### استخراج محصولات PCR از روی ژل آگارز

غلظت باندهای استخراج شده از روی ژل بین ۱۰۰ تا ۱۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و تمامی توالی‌های خوانش شده توسط نرم‌افزار مورد بازبینی قرار گرفتند و صحت تمامی منحنی‌های نوکلئوتیدی ارزیابی شده برای ورود به نرم‌افزار Mega X تایید شد.

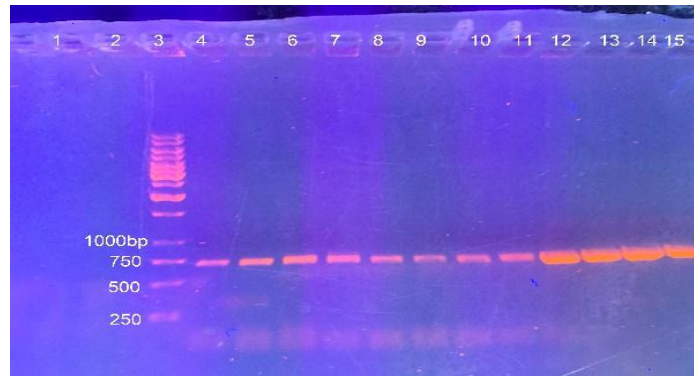


شکل ۱: DNA ژنومی استخراج شده از باله تاس‌ماهی ایرانی (۱) و DNA ژنومی انسانی (۲)

میزان جذب DNAهای استخراج شده ۴ نمونه از کرم خاویار در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ ۵، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ نانوگرم به دست آمد. میزان جذب DNA استخراج شده عصاره خاویار ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. در این بررسی خلوص DNAهای استخراجی با وجود این که از نمونه‌های نامتعارفی مثل کرم و عصاره خاویار استخراج شده بودند، در محدوده ۲-۱/۸ قرار داشت.

#### نتایج PCR برای ژن‌های *COI* و *Cyt b*

ژن *COI* قطعه‌ای به اندازه تقریباً ۶۵۰ نوکلئوتیدی را تکثیر کرد. در تاس‌ماهی ایرانی و کرم و عصاره خاویار باند ۶۵۰ بازی میتوکندیایی تکثیر شد و به جهت این که این آغازگر برای ژنوم ماهی طراحی شده است و در انسان محل



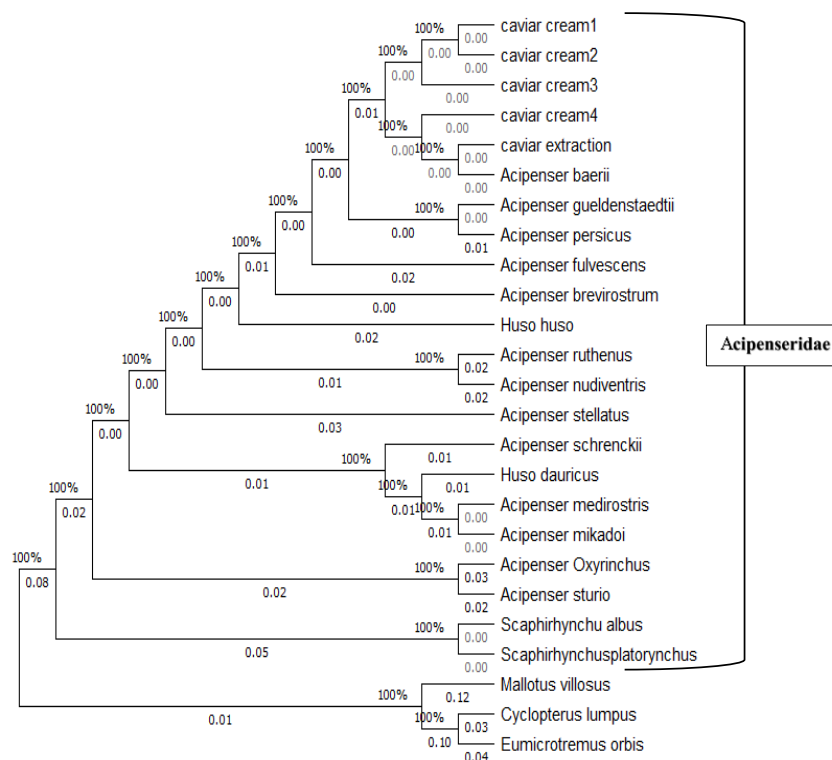
شکل ۲: تکثیر قطعه ۶۵۰ نوکلئوتیدی ژن *COI* در کرم و عصاره خاویار و ژنوم تاس ماهی ایرانی. ردیف ۱: محصول PCR تکثیر شده با ژنوم انسانی که روی ژل هیچ محصول دیده نشد. ردیف ۲: شاهد منفی که محصول PCR محتویات لوله بدون DNA است. ردیف ۳: نشانگر مولکولی. ردیف‌های ۴ تا ۷: محصول PCR عصاره خاویار (گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد). ردیف‌های ۸ تا ۱۱: محصول PCR کرم خاویار (گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد). ردیف‌های ۱۲ تا ۱۵: محصول PCR بافت تاس ماهی ایرانی (گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد). بهترین دمای الحاق ۵۹ درجه سانتی‌گراد بود.



شکل ۳: تکثیر قطعه تقریباً ۱۲۰۰ نوکلئوتیدی ژن *Cyt b* در کرم و عصاره خاویار، تاس ماهی ایرانی و انسان. ردیف‌های ۱ تا ۴: محصول تکثیر شده PCR بافت تاس ماهی ایرانی (گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد). ردیف‌های ۵ تا ۸: محصول PCR عصاره خاویار (گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد). ردیف‌های ۹ تا ۱۲: محصول PCR ژنوم انسانی (گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد). ردیف ۱۳: نشانگر مولکولی. ردیف‌های ۱۴ تا ۱۶: محصول PCR کرم خاویار (گرادیانت دمایی از ۵۵ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد). بهترین دمای الحاق ۵۹ درجه سانتی‌گراد بود.

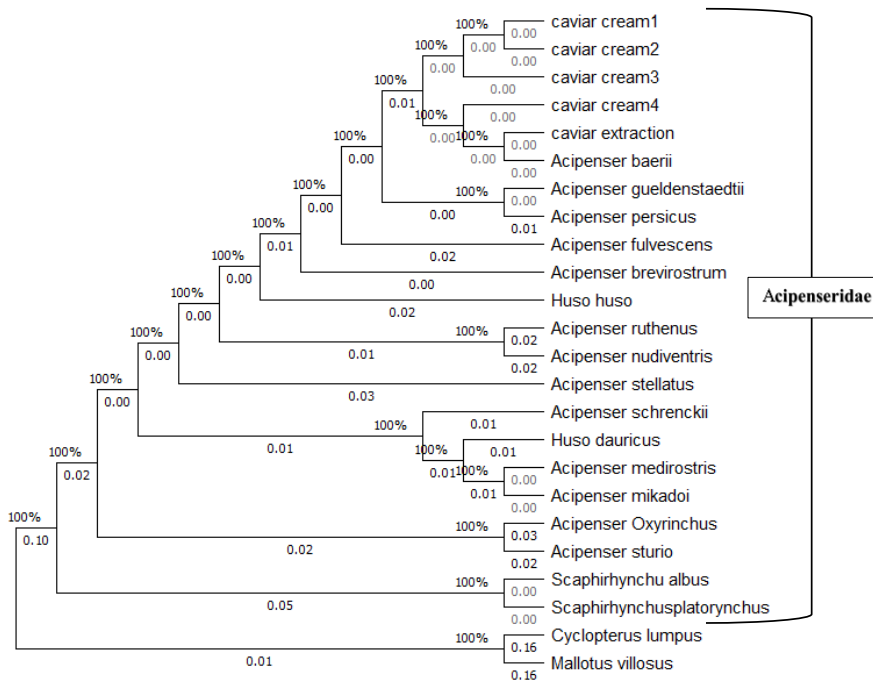
این خانواده بودند و تقلبی نبودند. همچنین اعداد به دست آمده از رسم درخت فیلوژنی بر اساس میزان ارتباط گونه‌های موجود در دندوگرام (درخت) نشان داد که بین گونه‌هایی که از آن‌ها خاویار تقلبی ساخته می‌شود و DNA گونه موجود در کرم، اختلاف بسیار زیادی وجود دارد.

درخت فیلوژنی ژن *COI* و ژن *Cyt b* جایگاه قرابت فیلوژنی مواد ژنتیکی موجود در چهار عدد کرم خاویار و یک عدد عصاره خاویار بر اساس ژن‌های *COI* و *Cyt b* در شکل‌های ۴ (بر اساس درخت فیلوژنی ژن *COI*) و ۵ (بر اساس درخت فیلوژنی ژن *Cyt b*) نشان داد کرم‌ها و عصاره ارزیابی شده برای تایید وجود مواد ژنتیکی تاس‌ماهیان مربوط به



شکل ۴: درخت فیلوژنی Neighbor-Joining که نشان دهنده ارتباط نمونه‌های نامشخص کرم‌ها (۱، ۲، ۳ و ۴) و عصاره خاویار بر اساس توالی ژن *COI* با اندازه تقریبی کمتر از ۶۵۰ نوکلئوتید برای ارزش‌گذاری

نمونه‌هایی که حاوی DNA تاس ماهیان بودند. اعداد درصدی روی درخت نشان دهنده آنالیز Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار است. همان طور که مشاهده می‌شود جایگاه توالی‌های به دست آمده از کرم‌ها و عصاره خاویار در Clade مربوط به تاس ماهیان قرار گرفته است و بسیار نزدیک به تاس ماهی سیبری است. سه ماهی که از آن‌ها خاویار تقلبی درست می‌شود در Clade تاس ماهیان قرار نگرفته‌اند و نمونه‌های کرم و عصاره خاویار از نظر اعداد فاصله زیادی دارند.



شکل ۵: درخت فیلوژنی Neighbor-Joining که نشان دهنده ارتباط نمونه‌های نامشخص کرم‌ها (نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴) و عصاره خاویار بر اساس توالی ژن *Cyt b* با اندازه تقریبی کمتر از ۱۲۰۰ نوکلئوتید برای ارزش‌گذاری نمونه‌هایی که حاوی DNA تاس ماهیان بودند. اعداد درصدی روی درخت نشان دهنده آنالیز Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار است. همان طور که مشاهده می‌شود جایگاه توالی‌های به دست آمده از کرم‌ها و عصاره خاویار در Clade مربوط به تاس ماهیان قرار گرفته است و بسیار نزدیک به تاس ماهی سیبری است. دو ماهی که از آن‌ها خاویار تقلبی درست می‌شود در Clade تاس ماهیان قرار نگرفته‌اند و نمونه‌های کرم و عصاره خاویار از نظر اعداد فاصله زیادی دارند (توالی ژن *Cyt b* از ماهی *Eumicrotremus orbis* در بانک ژنی موجود نبود).

## بحث

شمال آمریکا و کانادا که مدعی فروش گونه خاصی از ماهیان بودند، با استفاده از ژن *COI* انجام شد، نتیجه‌گیری شد که حدود ۲۵ درصد از این غذاها همان گونه ماهی نبودند. بیش از یک دهه است که بررسی ژن میتوکندریایی *COI* به عنوان روش سریع و بسیار موثر برای تشخیص گونه در ماهیان پذیرفته شده است. منطقه بارکدینگ *COI* در ماهیان، منطقه محدودی از ژنوم میتوکندری یعنی حدود ۶۵۰ نوکلئوتید است که به عنوان روش تشخیصی کارآمدی در ماهیان برای تشخیص گونه به کار می‌رود (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b; Dasmahapatra and Mallet, 2006). پژوهشگری به نام Popa و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کشور رومانی با استفاده از ژن *COI* بسیاری از نمونه‌های ماهیان اقتصادی و پراهمیت اکولوژیک را که در بازار ماهی به عنوان ماهی با ارزش شیلاتی حاصل از صید و آبی‌پروری در خانواده‌های تاسماهیان و آزادماهیان موجود بودند، با استفاده از بررسی توالی ناحیه بارکدینگ ماهی مورد شناسایی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که اگرچه این نشانگر توانایی شناسایی گونه‌ای را در اغلب آزادماهیان دارد، اما برای صحت‌گذاری بر روی هیبریدهای تاسماهیان، مشکل است. اما

یکی از چالش‌های موجود در بخش پژوهش‌های مولکولی آبزیان، ردیابی و شناسایی خاویار اصل از تقلبی است، چون قیمت و ارزش غذایی خاویار ساخته شده از ماهیان غیرخاویاری با خاویار به دست آمده از تاسماهیان بسیار متفاوت است. علاوه بر این، خاویار تقلبی ممکن است از موادی غیر از تخم آبزیان و تاسماهیان درست شده باشد. پژوهشگری به نام Ludwig و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که از هر ۲۷ گونه خاویار موجود در بازار در کشورهای رومانی و بلغارستان، تنها ده عدد از آنها به درستی از خاویار تاسماهیان درست شده‌اند و بقیه از تخمک *Cyclopterus lumpus* هستند که یک گونه کم ارزش است. همچنین محصولات بهداشتی آرایشی که مدعی استفاده از عصاره خاویار در فرآورده خود هستند نیز باید برای وجود عصاره خالص خاویار تاسماهیان مورد ارزیابی قرار گیرند. از طرفی در بسیاری از رستوران‌ها هم که مدعی استفاده از گوشت مرغوب و یا گونه خاصی از ماهی خاویاری هستند، علاوه بر ارزیابی شکل و بافت گوشت، باید گوشت ماهی از نظر مولکولی مورد ارزیابی قرار گیرد. در بررسی که توسط Wong و Hanner در سال ۲۰۰۸ روی ۹۶ رستوران از

نتیجه‌گیری کلی آن‌ها این بود که نشانگر ناحیه بارکدینگ *COI* روشی ساده و ارزان برای تشخیص محصولات هستند که به اشتباه ارزش‌گذاری شده‌اند (Popa et al., 2017). پژوهشگری به نام Waraniak و همکاران در سال ۲۰۱۷ هم با استفاده از طراحی آغازگرهای مختص گونه‌ای ناحیه بارکدینگ *COI*، لارو گونه تاس‌ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) را در محتویات دستگاه گوارش شکارچیان ماهی در بالادست رودخانه سیاه امریکا شناسایی کردند تا بتوانند گونه تاس‌ماهی مورد تغذیه ماهیان شکارچی را مشخص کنند. همچنین در بسیاری از مطالعات شناسایی گونه‌ای، ژن سیتوکروم اکسیداز *b* (*Cyt b*) که ژن دیگری از میتوکندری است برای شناسایی گونه در جانوران به کار می‌رود. میزان تغییر در این ژن نسبت به ژن‌های دیگر میتوکندری بالاتر است و از گذشته برای بررسی قرابت فیلوژنی در خیلی از ماهیانی که از نظر فیلوژنی به هم نزدیک هستند یا هنوز وضعیت فیلوژنی ابهام دارند، مثل تاس‌ماهی ایرانی و روسی (چالباش) و تاس‌ماهی سیبری به کار رفته است (Ciftci et al., 2013). در پژوهش حاضر از دو ژن برای ارزیابی وجود یا عدم وجود DNA تاس‌ماهیان در کرم و عصاره خاویار استفاده شد که ژن *COI* از ژن‌های پذیرفته شده برای بارکدینگ ماهی است (Hebert et al., 2003a) و همین طور از ژن *Cyt b* که نشانگر گونه‌ای در بسیاری از جانوران است، استفاده شد. تفسیر نتایج و دندوگرام حاصل نشان داد که قطعه تکثیر شده از کرم و عصاره خاویار قرابت زیادی با تاس‌ماهیان و به ویژه تاس‌ماهی سیبری دارد و در Clade خانواده تاس‌ماهیان قرار می‌گیرد. نتایج بررسی هر دو ژن *COI* و *Cyt b* برای نمونه‌های کرم و عصاره خاویار که دارای DNA نامشخصی بودند نشان داد که به خانواده تاس‌ماهیان تعلق دارند و در گروه ماهیانی که از آن‌ها خاویار تقبلی ساخته می‌شود مثل *Cyclopterus lumpus* جای نمی‌گیرند. بررسی توالی ژنی در صورت موجود بودن امکانات توالی‌یابی از یک یا چند روز قابلیت جواب‌دهی به متقاضی بررسی نمونه را دارد منتها می‌توان در صورت امکان روش‌های دیگری را مانند روش Real Time PCR برای ارایه روش‌های دقیق‌تر تشخیصی به کار گرفت. Bergman و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از روش qPCR توانستند DNA محیطی آبزیان را با استفاده از روش Real Time PCR در محیط طبیعی زیست جانوران ردیابی کنند و این روش را به عنوان روشی جدید برای ارزیابی

خانواده تاس‌ماهیان بودند و شباهت بیشتری به گونه تاس‌ماهی سیبری از خود نشان دادند.

### تشکر و قدردانی

از شرکت درخواست کننده جهت تامین بودجه این پژوهش و همین‌طور آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر به جهت همکاری و فراهم‌سازی امکان انجام آزمایش‌های مولکولی سپاسگزاری می‌گردد.

بررسی پراکنش آبزیان ارائه دادند. بنابراین در بررسی صحت وجود DNA در محصولات ساخته شده از خاویار می‌توان گفت روشی که نیاز به امکانات کمتری داشته باشد و در مدت زمان کوتاه‌تری بتواند به نتیجه برسد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در نتیجه‌گیری کلی که بر اساس بررسی ژن‌های *COI* و *Cyt b* کرم‌ها و عصاره خاویار دریافتی از شرکت متقاضی برای بررسی وجود یا عدم وجود DNA بود، مشخص شد که تمامی نمونه‌های کرم و عصاره خاویار حاوی DNA



## منابع

- تشخیص هویت خاویار و ماهیان خاویاری دریای خزر. فصلنامه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱(۲): ۶۲-۵۱.
- مرادی ی. ۱۳۸۷. روش‌های فرآوری و کنترل کیفی خاویار. موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی. ۱۳۲ص.
- Bergman P., Schumer G., Blankenship S. and Campbell E. 2016.** Detection of adult green sturgeon using environmental DNA analysis. PLoS One, 11(4): 1-8 (e0153500).
- Bronzi P. and Rosenthal H. 2014.** Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview. Journal of Applied Ichthyology, 30: 1536-1546.
- Bronzi P., Rosenthal H. and Gessner J. 2011.** Global sturgeon aquaculture production: An overview. Journal of Applied Ichthyology, 27: 169-175.
- Ciftci Y., Eroglu O. and Firidin S. 2013.** Mitochondrial cytochrome b sequence variation in three sturgeon species (*A. stellatus* Pallas, 1771, *A. gueldenstaedtii* Brandt, 1833, *H. huso* Linnaeus, 1758) from the Black Sea Coasts of Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13: 291-303.
- Dasmahapatra K.K. and Mallet J. 2006.** DNA barcodes: Recent successes and future prospects. Heredity, 97(4): 254-255.
- Dawnay N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G.R. and Thorpe R.S. 2007.** Validation of the barcoding gene *COI* for use in forensic genetic species identification. Forensic Science International, 173: 1-6.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. and DeWaard J.R. 2003a.** Biological identification through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B, 270: 313-321.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S. and DeWaard J.R. 2003b.** Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B, 270: S96-S99.

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Koichiro Tamura. 2018.** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.
- Ludwig A., Debus L. and Jenneckens I. 2002.** A molecular approach to control the international trade in black caviar. *Hydrobiology*, 87(5-6): 661–674.
- Ludwig A., Lieckfeldt D. and Jahrl J. 2015.** Mislabeled and counterfeit sturgeon caviar from Bulgaria and Romania. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(4): 587–591.
- Marko P.B., Lee S.C., Rice A.M., Gramling J.M., Fitzhenry T.M., McAlister J.S., Harper G.R. and Moran A.L. 2004.** Mislabeled of a depleted reef fish. *Nature*, 430: 309–310.
- Pappalardo A.M. and Ferrito V. 2019.** A COI-Bar-RFLP strategy for the rapid detection of *Engraulis encrasicolus* in processed anchovy products. *Food Control*, 57: 385–392.
- Pappalardo A.M., Federico C., Sabella G., Saccone S. and Ferrito V. 2015.** A *COI* nonsynonymous mutation as diagnostic tool for intraspecific discrimination in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus). *PLoS ONE* 10(11): 1–12 (e0143297).
- Popa G.O., Dudu A., Banaduc D., Curtean-Banaduc A., Teodora Barbalata T., Alexandru Burcea A., Florescu L.E., Georgescu S. E. and Costache M. 2017.** Use of DNA barcoding in the assignment of commercially valuable fish species from Romania. *Aquatic Living Resources*, 30, 20: 1–12.
- Raymakers C. 2006.** CITES, the convention on international trade in endangered species of wild Fauna and Flora: Its role in the conservation of Acipenseriformes. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 53–65.
- Waraniak J., Blumstein D.M. and Scribner K.T. 2017.** Barcoding PCR primers detect larval lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in diets of piscine predators. *Conservation Genet Resource*, 10: 259–268.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R. and Hebert P.D.N. 2005.** DNA barcoding of Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)*, 360: 1847–1857.
- Wolf C., Rentsch J. and Hubner P. 1999.** PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1350–1355.
- Wong E.H.K. and Hanner R.H. 2008.** DNA barcoding detects

market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41: 828–837.

**Xiao W., Zhang Y. and Liu H. 2001.** Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei:

Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 18: 163–173.



Research Paper

## Investigating verification of sturgeon caviar in cosmetic products using barcoding method of mitochondrial genes

Shirin Jamshidi<sup>1\*</sup>, Mohammad Hasanzadeh Saber<sup>2</sup>

Received: July 2020

Accepted: September 2020

### Abstract

In order to evaluate the presence or absence of DNA in cream and caviar extract samples, four samples of cream and one sample of caviar extract were evaluated for DNA concentration using Nanodrop and agarose gel analysis. The amount of DNA extracted in the samples of cream and caviar extract based on Nanodrop measurement was equal to 5 to 20 ng/μL, but it was not possible to examine these samples on agarose gel due to the little concentration. In order to test for the presence or absence of caviar extract and cream in the cosmetic cream, the mitochondrial DNA tracing method of sturgeon species was used by amplifying important fragments in global barcoding tests such as cytochrome oxidase I (*COI*) and cytochrome *b* (*Cyt b*). Amplified fragments in cream and caviar extract were analyzed by sequencing. The fragment length in *COI* gene was 650 nucleotides and in *Cyt b* was 1200 nucleotides. The final results showed that the cream and extract samples contain sturgeon DNA. The sturgeon species used to make the cream was closer to the Siberian sturgeon species (*Acipenser baerii*).

**Key words:** *Caviar Cream, Caviar Extraction, COI, Cyt b, Barcoding.*

1- Assistant Professor in Department of Genetics and Biotechnology, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

2- Scientific Member in Department of Genetics and Biotechnology, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

\*Corresponding Author: [jamshidi99@yahoo.com](mailto:jamshidi99@yahoo.com)