



TaqMan Real-Time PCR Method for the Authentication of Chicken Burgers

Nasrin Karami¹, Nayeabali Rezvani², Milad Rouhi^{3,5}, Saba Yari⁴, Zahra Sarlak^{3,5}

¹ Graduated from the School of Nutrition Sciences and Food Technology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

² Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³ Research Center of Oils and Fats, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ MSc. in Genetic Science, Medical Genetics Laboratory, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁵ Department of Food Science and Technology, School of Nutrition Sciences and Food Technology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Received: 16 Apr 2025, Reciver in revised from: 11 Jun 2025, Accepted: 18 Jun 2025, Available online: 13 Sep 2025

doi: 10.22059/jvr.2025.384001.3462

J Vet Res, Volume 80, Number 3, 2025, 149-160

Abstract

BACKGROUND: The authentication of chicken burgers is important due to the use of soybean meal instead of chicken in chicken burgers.

OBJECTIVES: This study aims to assess the effectiveness of TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) method in authenticating the chicken burgers.

METHODS: The Cytochrome b (Cytb) and 18S rRNA genes were used for the chicken identification and endogenous control, respectively. The binary reference mixtures of chicken/soybean meal (containing 0.01, 0.1, 1, 10, and 100% chicken) were prepared for plotting the relative curves. The DNA serial dilutions extracted from the pure chicken sample were used to plot the absolute curves. The authentication was done after the acceptance of standard curves with satisfactory parameters using the model samples (the mixture chicken/soybean meal models of 60, 30, 10, and 5% and a chicken burger model of 75%).

RESULTS: The curves plotted for both relative and absolute models had acceptable parameters according to the criteria determined for quantitative PCR assays. The R^2 values of 0.9986 and 0.9993, the slopes of -3.2647 and -3.5333, and amplification efficiency percentages of 102.44% and 91.88% were obtained for the relative and absolute models, respectively. In the validation phase, the results showed that all samples analyzed using both models had satisfactory relative standard deviation percentage or accuracy (<25%), but the bias percentage (precision) for the absolute model was not within the acceptable range ($\pm 25\%$).

CONCLUSIONS: The relative model of TaqMan PCR has acceptable accuracy and precision and a sensitivity of 0.1% to estimate chicken meat in chicken burgers and can be used to authenticate the chicken burgers or prevent their mislabeling in the market.

Keywords: Authentication, Meat product, Mislabeling, PCR, Species identification

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Zahra Sarlak, Tel/Fax: +9883-37102001



How to cite this article:

Karami N, Rezvani N, Rouhi M, Yari S, Sarlak Z. TaqMan real-time pcr method for the authentication of chicken burgers. Journal of Veterinary Research, 2025; 80(3): 149-160. doi: 10.22059/jvr.2025.384001.3462

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The PCR primers and probs. FAM: 6-carboxy-fluorescein; MGB: Minor groove binder; NFQ: Non-fluorescent quencher; VIC: 2'-chloro-7'-phenyl-1, 4-dichloro-6-carboxyfluorescein.

Table 2. The cycle threshold (CT) values for serial dilutions of chicken DNA.

Table 3. The cycle threshold (CT) values for reference chicken/soybean meal mixtures.

Table 4. The results of validation using samples.

Table 5. The sensitivity of the chicken specific TaqMan PCR.

Figure 1. The absolute (A) and relative (B) standard curves.



اثر مدل سازی های TaqMan Real-time PCR برای اصالت سنجی برگرهای مرغ

نسرین کرمی^۱، نایب علی رضوانی^۲، میلاد روحی^{۳،۵}، صبا یاری^۴، زهرا سرلک^{۳،۵}

^۱ دانش آموخته دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۲ گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۳ مرکز تحقیقات روغن ها و چربی ها، پژوهشکده فناوری های سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۴ کارشناس آزمایشگاه رفرانس مرکزی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۵ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۲۷ فروردین ۱۴۰۴، تاریخ بازنگری: ۲۱ خرداد ۱۴۰۴، تاریخ پذیرش: ۲۸ خرداد ۱۴۰۴، تاریخ انتشار: ۲۲ شهریور ۱۴۰۴

doi: [10.22059/jvr.2025.384001.3462](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.384001.3462)

دوره ۸۰، شماره ۳، ۱۴۰۴، ۱۶۰-۱۴۹

چکیده

زمینه مطالعه: گزارش هایی حاکی از تقلب استفاده از کنجاله سویا به عنوان جایگزین بخشی از مرغ در برگرهای مرغ وجود دارد، بنابراین اصالت سنجی برگرهای مرغ از اهمیت بالایی برخوردار است.

هدف: باتوجه به کارآمد بودن روش های PCR در شناسایی گونه در فراورده های گوشتی، ۲ مدل و اعتبارسنجی با تکنیک TaqMan Real-time PCR برای اصالت سنجی برگر مرغ به کار گرفته شد.

روش کار: مناطق Cytb و ۱۸S rRNA به ترتیب برای شناسایی مرغ و کنترل داخلی استفاده شدند. مخلوط های مرجع مرغ/کنجاله سویا با درصد مرغ ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ (وزنی/وزنی) برای رسم منحنی استاندارد نسبی و رقت سریالی DNA استخراج شده از نمونه های مرغ خالص برای رسم منحنی مطلق به کار گرفته شدند. همچنین مرحله اعتبارسنجی پس از تأیید منحنی استاندارد دارای شاخص های قابل قبول، با استفاده از نمونه های مدل (مخلوط های مدل ۶۰، ۳۰، ۱۰ و ۵ درصد مرغ - سویا (وزنی / وزنی) و برگر ۷۵ درصد گوشت مرغ) انجام شد.

نتایج: منحنی های ترسیم شده برای هر دو مدل با استفاده از مخلوط های مرجع دارای شاخص های قابل قبول مطابق با معیارهای تعیین شده برای ارزیابی های qPCR بودند، به طوری که R^2 برای ۲ منحنی به ترتیب ۰/۹۹۸۶ و ۰/۹۹۹۳، شیب ۳/۲۶۴۷- و ۳/۵۳۳۳- و درصد کارایی تکثیر ۱۰۲/۴۴ و ۹۱/۸۸ تعیین شدند. همچنین در مرحله اعتبارسنجی، استفاده از نمونه های مدل و ارزیابی آن ها با تکنیک تعریف شده TaqMan-qPCR نشان داد که مقادیر درصد RSD (پارامتر دقت) قابل قبولی برای همه نمونه ها با استفاده از هر دو مدل (>۲۵ درصد) حاصل شد، اما مقادیر درصد Bias (پارامتر صحت) برای نمونه های مدل ارزیابی شده با مدل مطلق در محدوده قابل پذیرش (۲۵ درصد $\pm$) نبودند.

نتیجه گیری نهایی: مدل نسبی با دقت و صحت قابل قبولی و با حساسیت تشخیصی ۰/۱ درصد می تواند گوشت مرغ را در برگرهای مرغ شناسایی کند و برای اصالت سنجی برگرهای مرغ و جلوگیری از برچسب گذاری اشتباه در سطح عرضه به کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: اصالت سنجی، برگر، شناسایی گونه، محصولات گوشتی، PCR

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: زهرا سرلک، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

مقدمه

یکی از مهم ترین چالش ها برای جمعیت روبه رشد جهان، تأمین غذای کافی، ایمن و عاری از هرگونه تقلب است (۱). بعد از امنیت غذایی و ایمنی غذایی، اصالت سنجی مواد غذایی از نظر بررسی دقیق ترکیبات فرموله شده و ارزیابی نوع فرایند استفاده شده برای تهیه آن ها به موضوع بسیار مهمی برای حمایت از حقوق مصرف کنندگان تبدیل شده است (۲، ۳). درواقع امروزه تقلب در صنعت غذا به عنوان یک مشکل بزرگ، اهمیت پیدا کرده است و انگیزه برای دستیابی به سود اقتصادی بیشتر از دلایل اصلی تقلب عمدی توسط تولیدکنندگان

است. تقلب به اشکال مختلف رقیق سازی (Dilution)، جایگزینی (Substitution)، پنهان کاری (Concealment)، بهبودهای تأیید نشده (Unapproved enhancement)، برچسب زنی اشتباه (Mislabeling) جعل کردن (Counterfeiting)، بازار خاکستری (Gray market diversion)، سرقت (Theft) و انحراف (Over run) انجام می شود (۴).

تقلب در فروش گوشت به صورت خام و یا به صورت فراوری شده، از عمده ترین مسائلی است که به وفور در صنایع غذایی دیده می شود (۵، ۶). یکی از تقلب رایج در محصولات گوشتی، جایگزینی گوشت های ارزان تر به جای گوشت های باارزش تر است. این محصولات گوشتی فرموله شده با گونه های گوشتی ارزان تر و یا گونه های گوشتی غیرمجاز با برچسب های غیرواقعی (Mislabeling) به فروش می رسند (۷-۱۲). به هر حال اطلاعات صحیح در مورد ترکیبات فرموله شده بر روی برچسب مواد غذایی می تواند نگرانی های مصرف کنندگان را علاوه بر مسائل اقتصادی درباره ایمنی (عدم مصرف غذاهای آلرژن زا و غذاهای تغییر یافته ژنتیکی توسط برخی افراد)، محدودیت های مذهبی (ممنوعیت خوردن گوشت خوک توسط مسلمانان و یهودیان)، مسائل اخلاقی (رفاه حیوانات و تولید سازگار با محیط زیست)، انتخاب نوع رژیم غذایی (عدم مصرف غذاهای با کالری بالا) و سبک زندگی (گیاه خواری و ارگانیک مصرف کردن) برطرف کند (۱۳-۱۶). بر این اساس، این امر موجب نیاز به آنالیزهایی شده است که نه تنها بتوانند گونه های گوشتی موجود در غذاها را به طور قابل اعتماد شناسایی کنند، بلکه به اندازه کافی حساس و دقیق باشند تا برای ماتریکس های غذایی پیچیده و فراوری شده مانند محصولات گوشتی استفاده شوند (۱۷).

کشف تقلب های گوشتی با استفاده از مارک های مختلف انجام می شود: ۱. روش های PCR بر پایه دی اکسی ریبونوکلیک اسید (DNA)؛ ۲. روش های ایمونولوژیک بر پایه پروتئین ها؛ ۳. روش های اسپکتروسکوپی بر پایه متابولیت های خاص. مولکول DNA اطلاعات ژنتیکی را در خود ذخیره کرده، سپس تکثیر و در نهایت به نسل بعد منتقل می کند. با وجود اینکه برخی اطلاعات ژنتیکی در افراد یک گونه متفاوت است، اما میزانی از اطلاعات را که خاص همه افراد یک گونه است می تواند برای شناسایی نوع گونه در محصولات گوشتی به کار برده شود. مولکول DNA پایداری بالاتری نسبت به پروتئین ها (خصوصاً در فرایندهای حرارتی، فشار، فراوری شیمیایی و دهیدراسیون) دارد. بنابراین پایداری بالا و خاص بودن اطلاعات ژنتیکی برای هر گونه سبب می شود تکنیک های بر پایه DNA (روش های ژنومیک) مثل PCR برای تشخیص نوع گونه در محصولات گوشتی فراوری شده به عنوان تکنیک های معتبر بیشترین کاربرد را نسبت به سایر تکنیک ها داشته باشند (۱۸-۲۰). به هر حال، تکنیک های کیفی PCR نمی توانند یک تقلب عمدی را از یک آلودگی متقاطع (Cross contamination) در زنجیره تولید تشخیص دهند. بسیاری از مطالعات نشان داده اند تکنیک قابل حل، حساس، دقیق و در عین حال دارای قابلیت تشخیص کمی، تکنیک Real-time PCR (qPCR) است (۲۱). ضمناً روش Real-time PCR بر پایه پروب تک من به دلیل حساسیت بالاتر، قابلیت شناسایی چندین گونه در یک مخلوط واکنش (Multiplexing) PCR و تولید آمپلیکون های غیراختصاصی کمتر بر روش Real-time PCR که بر پایه رنگ سایبرگرین است، برتری دارد (۱۹-۲۱).

گوشت مرغ محبوب ترین منبع پروتئین گوشتی است. این امر به دلیل دسترسی بالا و ارزان تر بودن آن نسبت به گوشت قرمز و در عین حال عدم محدودیت فرهنگی یا مذهبی در مصرف آن است. همچنین عمده افزایش محبوبیت گوشت مرغ به دلیل آن است که می توان آن را به وعده های غذایی آماده تبدیل کرد (۲۲-۲۴). یکی از تقلب های گزارش شده در گوشت مرغ استفاده از پروتئین سویا به جای گوشت سفید در برگرهای مرغ به عنوان یک ماده جایگزین ارزان تر در فراورده فرموله می باشد و در نهایت این جایگزینی غیرمجاز بر روی برچسب ماده غذایی اعلام نمی شود. بنابراین علاوه بر اینکه این جایگزینی، ضررهای اقتصادی را برای مصرف کنندگان به دنبال داشته است، پروتئین های سویا به عنوان یک ماده آلرژن به واکنش های آلرژیک در برخی افراد منجر شده است (۲، ۲۵).

باتوجه به اینکه در ایران گزارش ها حاکی است که در برگرهای مرغ با ترکیبات و پروتئین های گیاهی تقلب می شود، اصالت سنجی (Authenticity) برگرهای مرغ اهمیت بالایی دارد. ضمناً از این نظر که تکنیک TaqMan Real-time PCR یک روش آنالیزی با دقت و صحت بالا در تشخیص کمی گونه های غیرمجاز است، در مطالعه حاضر به بررسی و تصدیق (Validation) مدل Real-time PCR (مطلق و نسبی) بر پایه پروب تک من برای اصالت سنجی برگرهای مرغ پرداخته شده است.

مواد و روش کار

آماده سازی تیمارها: مخلوط های مرجع حاوی ۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ درصد گوشت مرغ در ماتریکس کنجاله سویا (وزنی/وزنی) برای رسم منحنی استاندارد ساخته شد. مخلوط های مدل شامل ۶۰، ۳۰، ۱۰ و ۵ درصد گوشت مرغ در ماتریکس کنجاله سویا (وزنی/وزنی) نیز برای مرحله اعتبارسنجی تهیه شد. یک نمونه برگ مرغ نیز حاوی ۷۵ درصد (وزنی/وزنی) گوشت مرغ نیز برای مرحله اعتبارسنجی با اجزای گوشت مرغ (۷۵۰ گرم)، پیاز (۱۲۰ گرم)، آرد سوخاری (۵۰ گرم)، گلوتن گندم (۳۰ گرم)، نمک تصفیه شده (۱۰ گرم)، ادویه (۱۰ گرم)، فلفل دلمه (۱۰ گرم) و آب (۲۰ میلی لیتر) فرموله شد. همچنین تیمارهای ۱۰۰ درصد گوشت مرغ و ۱۰۰ درصد کنجاله سویا به ترتیب به عنوان تیمارهای کنترل مثبت و کنترل منفی به کار گرفته شدند.

استخراج و تعیین کمیت DNA: استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت FATGK (FAVORGEN Biotech) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit) (FAVORGEN Biotech Corp, Taiwan) با اندکی تغییرات انجام شد، به طوری که استخراج از ۳۰ میلی گرم نمونه در مراحل لیز کردن (استفاده از بافر FATG1، محلول پروتئیناز K، بافر FATG2 و اتانول ۹۸ درصد)، عبور لیزات مربوطه از ستون FATG، شست و شوی ستون با بافر شست و شو (۲ بار با W₁ buffer و W₂ buffer) و رهاش DNA از ستون با Elution buffer انجام شد. سپس کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر (NanoDrop ND1000 UV-Vis Spectrophotometer) تأیید گردید. نهایتاً تمام DNA های استخراج شده برای جلوگیری از واکنش های آنزیمی نامطلوب تا انجام فرایند PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

مجموعه های پرایمر و پروب: یک جفت پرایمر و پروب اختصاصی برای شناسایی گونه مرغ (*Gallus gallus*) از منطقه ژن Cytb طراحی گردید. همچنین یک جفت پرایمر و پروب عمومی یوکاریوتی دیگر برای کنترل داخلی واکنش های qPCR و بررسی نتایج مثبت و منفی کاذب از ژن ۱۸S rRNA انتخاب شد. توالی ژن ها از پایگاه داده های بیوتکنولوژی NCBI گرفته شد و برای طراحی پرایمرها از نرم افزارهای Gene Runner و SnapGene استفاده شد (جدول ۱).

شرایط تکثیر TaqMan-qPCR: قبل از آنالیز با qPCR، غلظت تمام عصاره های استخراجی تا ۵ نانوگرم/میکرولیتر تعدیل شد. مخلوط های واکنش استریپ های PCR به حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی مستر میکس (۱۰ میکرولیتر)، ۲ جفت پرایمر (از هر پرایمر ۰/۸ میکرولیتر)، ۲ پروب (از هر کدام ۰/۴ میکرولیتر)، DNA های استخراجی (۲ میکرولیتر) و آب (۴ میکرولیتر) تهیه شدند.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به پرایمرها و پروب ها.

گونه	ست پرایمر / پروب	ژن هدف	سایز آمپلیکون (جفت باز)
یوکاریوت	F:GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC R: ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC Probe: VIC- AAGTGGACTCATTCCAATTACAGGGCCT-MGB-NFQ	۱۸S rRNA	۱۴۱
مرغ (<i>Gallus gallus</i>)	F:TCTGGGCTTAACCTCTCATACTCACC R: GGTACTAGTGGGTTTGCTGGG Probe: FAM-CATTCTTAACACTAGCCCTA-MGB-NFQ	Cytb	۱۰۶

جدول ۲. مقادیر Ct به دست آمده برای رقت های سریالی DNA مرغ.

میزان DNA (نانوگرم)	لگاریتم میزان DNA (نانوگرم)	روز اول	روز دوم	روز سوم	میانگین $\pm$ انحراف معیار
۱۰	۱	۲۱/۹	۲۱/۵۶	۲۱/۴۶	۲۱/۶۴ $\pm$ ۰/۲۳
۱	۰	۲۴/۹۸	۲۴/۶۵	۲۴/۹	۲۴/۸۴ $\pm$ ۰/۱۷
۰/۱	-۱	۲۸/۲۶	۲۸/۶۴	۲۸/۵۹	۲۸/۵۰ $\pm$ ۰/۲۱
۰/۰۱	-۲	۳۱/۹	۳۲/۰۴	۳۱/۹۱	۳۱/۹۵ $\pm$ ۰/۰۸
۰/۰۰۱	-۳	۳۴/۷۹	۳۶/۵۵	۳۵/۹۲	۳۵/۷۵ $\pm$ ۰/۸۹

جدول ۳. مقادیر Ct به دست آمده برای مخلوط‌های مرجع مرغ / سویا.

مخلوط مرجع مرغ (درصد)	لگاریتم مخلوط مرجع	روز اول	روز دوم	روز سوم	میانگین $\pm$ انحراف معیار
۱۰۰	۲	۲۱/۳	۲۰/۲۵	۲۰/۳۶	۲۰/۶۴ $\pm$ ۰/۵۸
۱۰	۱	۲۴/۷۸	۲۳/۷۴	۲۳/۹۶	۲۴/۱۶ $\pm$ ۰/۵۵
۱	۰	۲۷/۸۸	۲۷/۲۱	۲۷/۴۳	۲۷/۵۱ $\pm$ ۰/۳۴
۰/۱	-۱	۳۰/۹۹	۳۰/۷۴	۳۰/۶۵	۳۰/۷۹ $\pm$ ۰/۱۸
۰/۰۱	-۲	۳۳/۹۷	۳۳/۴۴	۳۳/۵۲	۳۳/۶۴ $\pm$ ۰/۲۹

جدول ۴. نتایج مرحله اعتبارسنجی با استفاده از نمونه‌های مدل.

نمونه‌های مدل (وزنی / وزنی)	نوع روش مدل‌سازی	درصد تخمین مرغ (وزنی / وزنی)	میانگین $\pm$ انحراف معیار	درصد (درصد)
۷۵ درصد	مطلق	روز اول: ۹۸/۶۹ روز دوم: ۹۳/۰۶ روز سوم: ۹۴/۲۹	۹۵/۳۵ $\pm$ ۲/۹۶	۲۷/۱۳
۶۰ درصد	نسبی	روز اول: ۶۲/۲۸ روز دوم: ۵۸/۴۵ روز سوم: ۵۹/۲۸	۶۰/۰۰ $\pm$ ۲/۰۲	۳/۳۶
۳۰ درصد	مطلق	روز اول: ۷۶/۰۴ روز دوم: ۸۱/۱۶ روز سوم: ۶۷/۶۲	۷۴/۹۴ $\pm$ ۶/۸۴	۹/۱۲
۱۰ درصد	نسبی	روز اول: ۴۶/۹۷ روز دوم: ۵۰/۴۰ روز سوم: ۴۱/۳۷	۴۶/۲۵ $\pm$ ۴/۵۶	۹/۸۶
۵ درصد	مطلق	روز اول: ۳۶/۸۹ روز دوم: ۳۹/۱۲ روز سوم: ۴۰/۶۸	۳۸/۸۹ $\pm$ ۱/۹۰	۴/۸۹
	نسبی	روز اول: ۲۱/۴۷ روز دوم: ۲۲/۸۸ روز سوم: ۲۳/۸۷	۲۲/۷۴ $\pm$ ۱/۲۰	۵/۳۰
	مطلق	روز اول: ۱۴/۷۲ روز دوم: ۱۴/۰۶ روز سوم: ۱۳/۴۳	۱۴/۰۷ $\pm$ ۰/۶۴	۴/۵۶
	نسبی	روز اول: ۷/۹۴ روز دوم: ۷/۵۶ روز سوم: ۷/۲۰	۷/۵۷ $\pm$ ۰/۳۷	۴/۹۴
	مطلق	روز اول: ۷/۲۸ روز دوم: ۶/۶۰ روز سوم: ۸/۶۲	۷/۵۰ $\pm$ ۱/۰۳	۱۳/۷۲
	نسبی	روز اول: ۳/۷۱ روز دوم: ۳/۳۴ روز سوم: ۴/۴۵	۳/۸۳ $\pm$ ۰/۵۷	۱۴/۸۶

فرایند تکثیر به وسیله دستگاه Real-time PCR System (Applied Biosystem) StepOne™ دارای ۴۸ خانه تحت شرایط مرحله آغاز (Initialization step) فقط ۱ بار در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و برای ۴۰ چرخه به ترتیب ۲ مرحله دناتوراسیون (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه) و اتصال/طویل شدن (۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) انجام شد.

مدل سازی مطلق TaqMan-qPCR: در مدل مطلق، غلظت DNA استخراجی حاصل از عضله مرغ تا ۵ نانوگرم/میکرولیتر تعدیل شد و از آن رقت‌های سریالی ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۰۵ نانوگرم/میکرولیتر ساخته شد. سپس ۲ میکرولیتر از DNAهای رقیق شده به ۱۸ میکرولیتر از مخلوط‌های واکنش در استریپ‌های PCR اضافه شد که معادل ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ نانوگرم DNA مرغ است. یک منحنی مطلق از لگاریتم مقادیر DNA (X) و میانگین Ct‌های به دست آمده از هر رقت (Y) ترسیم شد و معادله خط آن به دست آمد که شیب و عرض از مبدأ از این معادله خط مشخص گردید. بنابراین برای یک نمونه مجهول پس از تعدیل DNA استخراجی آن تا ۵ نانوگرم بر میکرولیتر، مقدار Ct به دست آمده از آن در فرمول $10^{[(Ct-b)/a]}$ قرار گرفت تا مقدار DNA مرغ (نانوگرم) محاسبه شود (پارامتر a شیب و پارامتر b عرض از مبدأ منحنی استاندارد است). سپس تخمین گوشت مرغ به صورت فرمول شماره ۱ تعیین شد:

$$۱. \text{ درصد گوشت مرغ} = \text{محتوای DNA مرغ (نانوگرم)} / \text{محتوای DNA اولیه مرغ (۱۰ نانوگرم)} \times ۱۰۰$$

مدل سازی نسبی TaqMan-qPCR: در مدل نسبی، DNAهای استخراجی حاصل از مخلوط‌های مرجع (۱۰۰-۰/۰۱ درصد (وزنی/وزنی)) تا ۵ نانوگرم/میکرولیتر رقیق شدند. سپس ۲ میکرولیتر از هر محلول DNA به ۱۸ میکرولیتر از مخلوط‌های واکنش در استریپ‌های PCR اضافه گردید. یک منحنی نسبی از لگاریتم درصد گوشت مرغ مخلوط‌های گوشتی مرجع (X) و میانگین Ct‌های به دست آمده برای مخلوط‌های واکنش آن‌ها (Y) رسم شد. بنابراین مقدار گوشت مرغ نمونه‌های مجهول از طریق درون‌یابی و فرمول شماره ۲ تخمین زده شد:

$$۲. \text{ درصد گوشت مرغ} = 10^{[(Ct-b)/a]}$$

بررسی پارامترهای منحنی‌های استاندارد: منحنی‌های استاندارد در سنجش‌های Real-time PCR به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی عملکرد در نظر گرفته می‌شوند. معیارهای پذیرش مربوط به منحنی‌های کالیبراسیون سنجش‌های qPCR به شرح زیر بیان شده است:

محدوده دینامیکی خطی به‌طور ایده‌آل باید بیش از ۴ مرتبه بزرگی ($\log_{10}$) باشد. درصد کارایی تکثیر که از طریق فرمول شماره ۳ محاسبه گردیده است، می‌بایست بین ۹۰ تا ۱۱۰ درصد باشد که با شیب رگرسیون بین $-3/1$ و $-3/6$ مطابقت دارد. ضمناً مقدار ضریب تعیین (R^2) بالا $0/98 < R^2$ قابل‌پذیرش می‌باشد (۲۶).

$$3. \text{ درصد کارایی تکثیر} = [(10^{(-1/\text{شیب})} - 1) \times 100]$$

بررسی حساسیت تکنیک: مقادیر Ct مخلوط‌های مرجع ۱ و ۰/۰۱ درصد (وزنی/وزنی) در ۲۰ تکرار قرائت شد. LOD (Limit of detection) کم‌ترین غلظتی بود که ۹۵ درصد تکرارهای آزمون تا سیکل ۴۰ (آخرین سیکل تعیین‌شده در مطالعه حاضر) به‌طور صحیح تعیین مقدار شدند و LOQ (Limit of quantification) کم‌ترین غلظتی بود که علاوه بر تعیین مقدار، واجد پارامترهای درصد RSD (Relative Standard Deviation/%) و درصد Bias قابل‌قبولی (به ترتیب < 25 درصد و محدوده ± 25 درصد) نیز باشد (۱۹، ۲۶).

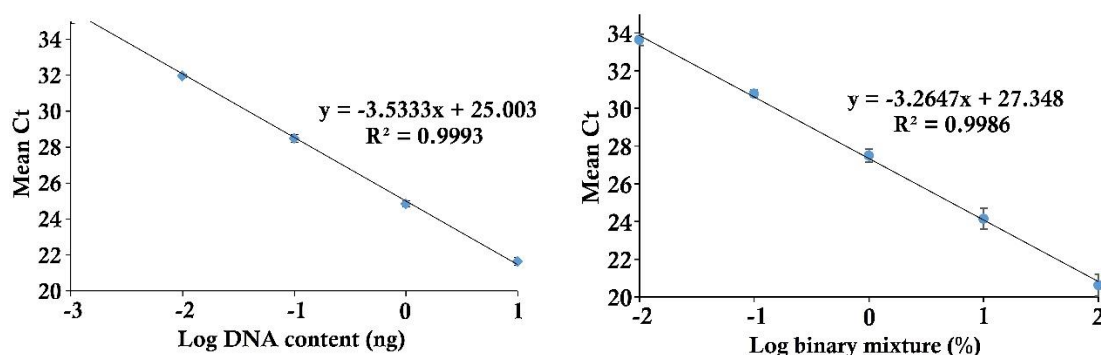
اعتبارسنجی مدل: جهت اعتبارسنجی ۲ مدل طراحی شد (مطلق و نسبی) و میانگین مقادیر Ct مخلوط‌ها و برگر مدل (مخلوط‌های مدل حاوی ۶۰، ۳۰، ۱۰ و ۵ درصد مرغ (وزنی/وزنی) و برگر مدل حاوی ۷۵ درصد گوشت مرغ بودند) با استفاده از معادله خط آن‌ها به دست آمد و ۲ پارامتر دقت (درصد RSD) و صحت (درصد Bias) برای هر نمونه مدل مطابق فرمول‌های شماره ۴ و ۵ محاسبه شدند (۱۷):

$$4. \text{ Bias (درصد)} = [(\text{مقدار واقعی} - \text{مقدار تخمین زده‌شده}) / \text{مقدار واقعی}] \times 100$$

$$5. \text{ RSD (درصد)} = \text{انحراف استاندارد نسبی} = \text{انحراف استاندارد} / \text{میانگین} \times 100$$

جدول ۵. تعیین حساسیت تکنیک Chicken specific TaqMan-qPCR با مدل نسبی.

مخلوط مرجع (درصد)		Ct		تخمین مرغ (وزنی/وزنی)		(درصد)	
		برای ۲۰ تکرار		میانگین $\pm$ انحراف معیار		SD	
۰/۱		۳۰/۸۰	۳۰/۵۱	۰/۰۸۸	۰/۱۰۸	۱۱/۹۶۵	-۰/۰۹۸
		۳۰/۵۵	۳۰/۴۳	۰/۱۰۵	۰/۱۱۴		
		۳۰/۷۷	۳۰/۳۸	۰/۰۸۹	۰/۱۱۸		
		۳۰/۶۶	۳۰/۵۹	۰/۰۹۷	۰/۱۰۲		
		۳۰/۷۱	۳۰/۶۳	۰/۰۹۳	۰/۰۹۹		
		۳۰/۷۶	۳۰/۷۱	۰/۰۹۰	۰/۰۹۳		
		۳۰/۵۸	۳۰/۷۴	۰/۱۰۲	۰/۰۹۱		
		۳۰/۸۵	۳۰/۳۶	۰/۰۸۵	۰/۱۲۰		
		۳۰/۴۷	۳۰/۸۱	۰/۱۱۱	۰/۰۸۷		
		۳۰/۸۳	۳۰/۳۳	۰/۰۸۶	۰/۱۲۲		
۰/۰۱		۳۲/۹۱	۳۴/۲۳	۰/۰۲۰	۰/۰۰۸	۴۵/۷۷۲	۵۰/۶۶۵
		۳۳/۶۴	۳۲/۷۷	۰/۰۱۲	۰/۰۲۲		
		۳۳/۵۶	۳۳/۵۱	۰/۰۱۳	۰/۰۱۳		
		۳۴/۰۱	۳۳/۶۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۱		
		۳۳/۸۷	۳۲/۸۸	۰/۰۱۰	۰/۰۲۰		
		۳۲/۹۱	۳۴/۱۲	۰/۰۲۰	۰/۰۰۸		
		۳۳/۵۲	۳۴/۲۵	۰/۰۱۳	۰/۰۰۸		
		۳۳/۷۷	۳۲/۲۸	۰/۰۱۱	۰/۰۳۱		
		۳۴/۱۰	۳۳/۲۱	۰/۰۰۹	۰/۰۱۶		
		۳۲/۳۵	۳۲/۹۳	۰/۰۲۹	۰/۰۲۰		



تصویر ۱. منحنی‌های استاندارد مطلق (1A) و نسبی (1B).

بدین صورت، نزدیکی نتایج آزمایش به مقدار واقعی Bias نامیده می‌شود، اما RSD (انحراف استاندارد نسبی) نزدیکی نتایج به دست آمده در شرایط تعریف شده است. ضمناً معیارهای پذیرش این دو پارامتر در ارزیابی‌های Real time PCR به ترتیب در محدوده ۲۵ درصد $\pm$ و > 25 درصد تعیین شده است.

تجزیه و تحلیل آماری: برای بررسی تکثیرپذیری (Reproducibility) یا دقت بین آنالیزی، سنجش‌ها در ۳ روز مختلف و جهت بررسی تکرارپذیری (Repeatability) یا دقت درون آنالیزی، سنجش‌ها در هر روز در ۳ تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل آماری در مرحله مدل سازی و اعتبارسنجی با استفاده از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ انجام شد.

نتایج

کمیت و کیفیت DNA استخراجی: غلظت DNA با استفاده از جذب UV در طول موج ۲۶۰ نانومتر به وسیله نانودراپ تعیین شد. همچنین خلوص DNA استخراجی با استفاده از نسبت جذب در طول موج‌های (نانومتر) A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{230} بررسی شد. در مطالعه حاضر، غلظت DNAهای استخراجی در رنج $58/4 - 276/9$ نانوگرم/میکرولیتر و نسبت جذب A_{260}/A_{280} از $1/83$ تا $2/02$ بود.

بررسی ست پرایمر / پروب طراحی شده: متوسط مقادیر Ct ها با استفاده از پرایمر/پروپ اختصاصی مرغ برای نمونه‌های کنترل مثبت (گوشت خالص مرغ)، کنترل منفی (کنجاله سویا) و نمونه شاهد یا بلانک (مخلوط واکنش بدون DNA الگو) به ترتیب $20/63$ ، Undetermined (عدم تشخیص) و Undetermined (تا سیکل ۴۰) حاصل شد. این مقادیر با استفاده از پرایمر/پروپ عمومی S $18rRNA$ یوکاریوتی به ترتیب $21/27$ ، Undetermined و Undetermined به دست آمد. همچنین ارزیابی‌های بیشتر برای اطمینان از اختصاصیت پرایمر/پروپ‌های طراحی شده با گوشت ۱۲ گونه جانوری دیگر (اسب (*Equus caballus*)، الاغ (*Equus asinus*)، خوک (*Sus scrofa*)، گوسفند (*Ovis aries*)، بز (*Capra hircus*)، شتر (*Camelus dromedaries*)، بوقلمون (*Meleagris gallopavo*)، اردک (*Anas platyrhynchos*)، غاز (*Anser anser*)، قرقاول (*Phasianus colchicu*)، بلدرچین (*Coturnix coturnix*) و شترمرغ (*Struthio camelus*) انجام شد و تا سیکل ۴۰ در مخلوط‌های واکنش PCR حاوی پرایمر/پروپ اختصاصی گونه مرغ سیگنالی مشاهده نشد.

مدل سازی مطلق TaqMan-qPCR: در این مدل، منحنی استاندارد با استفاده از لگاریتم ۵ سری رقت سریالی DNA استخراجی مرغ از ۱۰ نانوگرم تا $0/001$ نانوگرم (محور X) در مقابل میانگین Ct های حاصل از این مقادیر DNA در مخلوط‌های واکنش qPCR (محور Y) ترسیم شد. جدول ۲ مقادیر Ct به دست آمده برای رقت‌های سریالی DNA را در ۳ روز مختلف نشان می‌دهد (در هر روز، میانگین ۳ تکرار نوشته شده است). یک معادله خط $Y = -3/5333 X + 25/003$ برای منحنی مطلق به دست آمد. همان طور که

در تصویر 1A مشاهده می‌شود، مشخصه‌های تکثیر این منحنی استاندارد ترسیم‌شده برای R^2 ، شیب، عرض از مبدأ و درصد کارایی تکثیر به ترتیب برابر با ۰/۹۹۹۳، ۳/۵۳۳۳، ۲۵/۰۰۳ و ۹۱/۸۸ تعیین شد.

مدل‌سازی نسبی TaqMan-qPCR: در مدل نسبی از مخلوط‌های حاوی ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ۰/۱ درصد گوشت مرغ در ماتریکس کنجاله سویا (وزنی/وزنی) استفاده شد. منحنی استاندارد نسبی با استفاده از لگاریتم درصد مرغ در این نمونه‌های مرجع (محور X) در مقابل میانگین Ct های حاصل از عصاره DNA آن‌ها در مخلوط‌های واکنش PCR (محور Y) ترسیم شد (تصویر 1B). جدول ۳ مقادیر Ct به دست آمده برای نمونه‌های مرجع را در ۳ روز مختلف نشان می‌دهد (در هر روز، میانگین ۳ تکرار نوشته شده است). در این روش، ژن rRNA ۱۸S نیز به عنوان کنترل داخلی و بررسی نتایج مثبت و منفی کاذب مورد هدف قرار گرفت. بنابراین در مخلوط‌های واکنش qPCR از ۲ ست پرایمر/پروب استفاده شد و یک Duplex TaqMan-qPCR اجرا شد. همان‌طور که در تصویر 1B مشاهده می‌شود، معادله خط این منحنی $Y = -3/2647 X + 27/348$ تعیین شد که تحت آن برای شیب، عرض از مبدأ، R^2 و درصد کارایی تکثیر به ترتیب مقادیر $-3/2647$ ، $27/348$ ، $0/9986$ و $102/44$ به دست آمد.

اعتبارسنجی مدل‌ها: برای اعتبارسنجی ۲ مدل طراحی شده، پارامترهای RSD (درصد) و Bias (درصد) برای مخلوط‌های مدل (۶۰، ۳۰، ۱۰ و ۵ درصد (وزنی/وزنی)) و برگر مدل (۷۵ درصد) محاسبه شد (جدول ۴). همان‌طور در جدول ۴ که مشاهده می‌شود، مقادیر RSD (درصد) نمونه‌های مدل از ۳/۱۰ تا ۱۴/۸۶ درصد محاسبه شد.

همچنین مقادیر Bias (درصد) در مدل مطلق، برای مخلوط‌های مدل به ترتیب ۲۴/۹۰، ۲۹/۶۵، ۴۰/۷۱ و ۵۰/۰۵ و برای برگر مدل ۲۷/۱۳ محاسبه شد، اما در مدل نسبی، مقادیر Bias (درصد) از رنج ۲۰- تا ۲۴/۳۴- به دست آمدند.

تعیین حساسیت تکنیک: به منظور تعیین مقدار حساسیت تکنیک، غلظت DNA استخراج شده از ۲ مخلوط مرجع ۰/۱ و ۰/۰۱ درصد گوشت مرغ تا ۵ نانوگرم/میکرولیتر تعدیل شد و مخلوط‌های واکنش PCR آن‌ها با تکنیک تعریف شده TaqMan-qPCR در مطالعه حاضر در ۲۰ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، این مقادیر Ct به دست آمده در معادله خط نسبی $Y = -3/2647 X + 27/348$ به منظور تخمین درصد مرغ قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، مقادیر RSD (درصد) برای تکرارهای Ct مخلوط‌های مدل ۰/۱ و ۰/۰۱ درصد گوشت مرغ به ترتیب ۱۱/۹۶ و ۴۵/۷۷ محاسبه شدند و مقادیر Bias (درصد) تحت این شرایط برای این دو مخلوط مدل به ترتیب ۰/۰۹۸- و ۵۰/۶۶- به دست آمدند.

بحث

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی: غلظت عصاره‌های DNA استخراجی، مطابق با پروتکل ارزیابی‌های qPCR تعیین مقدار شد، به طوری که یک واحد جذب معادل با تقریباً ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر dsDNA بود. همچنین براساس پروتکل، DNA های استخراجی با کیفیت خوب باید نسبت A_{260}/A_{280} در محدوده ۱/۸-۲/۰ داشته باشند (۲۶). بنابراین در مطالعه حاضر، محدوده ۰/۲-۸۳/۱ برای نسبت جذب A_{260}/A_{280} نشان دهنده این بود که عصاره‌های DNA استخراجی تقریباً واجد کیفیت مطلوب بودند.

بررسی پرایمر/پروب طراحی شده: همان‌طور که گفته شد به وسیله پرایمر/پروب شناسایی گونه مرغ، متوسط مقادیر Ct برای نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی تحت شرایط ۴۰ سیکل، ۲۰/۶۳ و عدم تشخیص به دست آمد و سیگنال معنی داری نیز در بررسی روی ۱۲ گونه مورد مطالعه مشاهده نشد. بنابراین این نتایج همگی نشان دهنده این بود که ست پرایمر/پروب طراحی شده، کاملاً اختصاصی برای شناسایی گونه هدف است. ضمناً مقادیر Ct به وسیله پرایمر/پروب عمومی یوکاریوتی در مخلوط‌های واکنش تقریباً مشابه آنچه بود که به وسیله پرایمر/پروب اختصاصی مرغ به دست آمد (داده‌ها در جدول ذکر نشده است) که نشان دهنده تخریب کامل DNA های سویا در فرایندی بود که قبلاً لوبیای سویا را به کنجاله تبدیل کرده است.

جهت شناسایی مرغ از ژن Cytb از ژنوم میتوکندریایی استفاده شد. ژنوم میتوکندریایی به دلیل نوع آرایش خاص، توارث صرفاً مادری و تکامل سریع‌تر در مقایسه با ژنوم هسته‌ای در شناسایی تفاوت‌های بین گونه‌ای (حتی گونه‌های نزدیک به هم) و درون گونه‌ای کارا تر است. ضمناً کروی بودن و اندازه کوچک آن، تعدد بیشتر آن در سلول و کوتاه بودن توالی‌های ژنی، موفقیت آن را در شناسایی

محصولات غذایی فراوری شده بالا برده است. همچنین برخی از مطالعات توصیه کرده‌اند که به دلیل احتمال تخریب DNA در طی فراوری مواد غذایی بهتر است آمپلیکون‌های تکثیر شده طولی کمتر از ۱۵۰ جفت‌باز داشته باشند (۲۷). بنابراین در مطالعه حاضر ست پرایمر/پروب اختصاصی مرغ طوری طراحی شد که آمپلیکون‌های ۱۰۶ جفت‌باز تولید کردند.

مدل سازی مطلق TaqMan-qPCR: منحنی استاندارد مطلق که از طریق رقت سریالی DNA استخراجی مرغ در مقابل میانگین Ct‌های حاصل از آن‌ها رسم شد، یک معادله خط $Y = -3/5333 X + 25/0.3$ با ضریب تعیین 0.9993 را به دست آورد. مقدار درصد کارایی تکثیر $91/88$ درصد تعیین شد که با جای‌گذاری شیب منحنی مطلق ($-3/5333$) در فرمول شماره ۳ محاسبه شد.

بنابراین تمام مشخصه‌های تکثیر (R^2 ، شیب و درصد کارایی تکثیر) این منحنی استاندارد ترسیم‌شده، همان‌طور که در قسمت روش کار شرح داده شد، در محدوده معیارهای قابل‌پذیرش قرار داشتند. همچنین عرض از مبدأ (b) این منحنی با مقدار $25/0.3$ ، مقدار Ct بود که برای ۱ نانوگرم DNA مرغ در مخلوط‌های واکنش در استریپ‌های PCR به دست آمد.

مطالعه حاضر با مطالعه Kesmen و همکاران در سال ۲۰۱۲ که مدل مطلق TaqMan-Real time PCR را برای تخمین درصد مرغ در مخلوط‌های گوشتی خام و حرارت‌دیده به‌طور موفق‌تری به کار بردند، مقایسه شد. این مطالعه، منطقه ژنی NADH دهیدروژناز زیر واحد ۲ (ژن ND2 میتوکندری) برای طراحی پرایمر/پروب هدف‌گذاری و آمپلیکون‌هایی با ۸۶ جفت‌باز تولید شد. پروب طراحی شده با ریپورتر FAM و خاموش‌کننده TAMRA لیبل‌گذاری شد. برای رسم منحنی استاندارد، رقت‌های سریالی DNA استخراجی از ۱۰۰ نانوگرم تا ۰/۰۰۱ نانوگرم تهیه شدند. نهایتاً، منحنی استاندارد مطلق دارای معادله خط $Y = -3/1264 X + 24/461$ و شاخصه‌های R^2 و درصد کارایی تکثیر به ترتیب 0.9965 و $108/92$ به دست آمد و عرض از مبدأ منحنی ($24/461$) نیز مقدار Ct برای ۱ نانوگرم DNA بود (۲۸).

مدل سازی نسبی TaqMan-qPCR: در مدل نسبی از کالیبراتورهای مشابه نمونه‌های آنالیز شده استفاده شد. منحنی استاندارد نسبی با استفاده از مخلوط‌های مرجع و میانگین مقادیر Ct‌های حاصل از آن‌ها ترسیم شد. همچنین در این مدل یک Duplex TaqMan-qPCR اجرا شد. بدین صورت که مجموعه پرایمر/پروب انتخاب شده از منطقه ژنی ۱۸S rRNA نیز به عنوان کنترل داخلی در استریپ‌های PCR استفاده شد. مقادیر Ct با استفاده از این مجموعه پرایمر/پروب عمومی یوکاریوتی ۱۸S rRNA، تقریباً مشابه با نتایج حاصل از پرایمر/پروب اختصاصی مرغ حاصل شد. معادله خط این منحنی $Y = -3/2647 X + 27/348$ با ضریب تعیین 0.9986 و درصد کارایی تکثیر $102/44$ نشان‌دهنده مقادیر قابل‌قبول مشخصه‌های تکثیر بود. ضمناً عرض از مبدأ منحنی استاندارد نسبی ($27/348$) مربوط به متوسط Ct برای مخلوط مرجع با غلظت ۱ درصد بود. این مدل پیش‌تر در مطالعه Kang و Tanaka در سال ۲۰۱۸ برای تعیین مقدار جایگزینی گوشت خوک در محصولات گوشتی ادعاشده از گوشت گاو و در مطالعه Fajardo و همکاران در سال ۲۰۰۸ برای اصالت‌سنجی گوشت گونه‌های گوزن با به‌کارگیری تکنیک SYBR Green-qPCR استفاده شد (۱۷، ۲۹).

اعتبارسنجی مدل‌ها: محدوده $14/86-3/10$ مقادیر RSD (درصد) نمونه‌های مدل در هر دو روش مدل‌سازی نشان می‌دهد همه مقادیر در محدوده قابل‌پذیرش ارزیابی‌های Real time PCR می‌باشند (>25 درصد). به عبارت دیگر، این مقادیر نشان‌دهنده نزدیکی بین اندازه‌گیری‌های تکرار شده در شرایط یکسان آزمایش است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت هر دو مدل، دقت (پارامتر Precision) بالایی در تعیین درصد مرغ در مخلوط‌ها و برگ‌های مرغ دارند.

همان‌طور که در قسمت روش کار شرح داده شد، مقادیر درصد Bias (پارامتر Trueness) طبق معیارهای قابل‌پذیرش (۲۵ درصد $\pm$) تعیین شده است. بنابراین همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، در مدل مطلق، مقادیر Bias (درصد) برای همه نمونه‌های مدل به جز مخلوط ۶۰ درصد در رنج قابل‌قبول قرار نداشتند. این در حالی است که در مدل نسبی، همه مقادیر در محدوده قابل‌پذیرش ارزیابی‌های Real time PCR قرار داشتند. Bias (درصد) همان صحت یا درستی است که نزدیکی مقادیر اندازه‌گیری‌های آزمایش با مقدار واقعی را نشان می‌دهد. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود مدل نسبی علاوه بر دقت، صحت لازم را نیز در تعیین درصد مرغ دارد.

تعدادی از مطالعات، هدف‌گیری مناطق میتوکندریایی را نسبت به مناطق هسته‌ای در تشخیص نوع گونه موفق‌تر دانسته‌اند، زیرا کپی مارکرهای میتوکندریایی در هر سلول بسیار بیشتر از مارکرهای هسته‌ای است (۸، ۳۰). به هر حال تعداد کپی‌های ژن‌های

میتوکندریایی در افراد مختلف یک گونه و بافت‌های مختلف آن‌ها متفاوت است (۲۷). بنابراین تعدادی مطالعات، رسم منحنی استاندارد با استفاده از کالیبراتورهای مشابه با ماتریکس نمونه واقعی را موفق‌تر از رسم با رقیق‌سازی DNA استخراجی گزارش کرده‌اند (۸، ۱۹، ۲۶). در مطالعه‌ای که Kang و Tanaka در سال ۲۰۱۸ انجام داده‌اند، از روش SYBR Green qPCR برای تعیین میزان گوشت خوک در محصولات گوشتی فراوری شده از گوشت گاو استفاده کردند. این مطالعه نشان داد مدل نسبی در مقایسه با مدل مطلق، مقادیر درصد Bias بهتری را ارائه می‌دهد (۱۷)، باوجود این Kim و Kim در سال ۲۰۱۹ گزارش کرده‌اند که مدل مطلق و ارزیابی‌های TaqMan-qPCR دقت و صحت کافی را در تخمین میزان گوشت مرغ در محصولات گوشتی دارد (۱۳).

تعیین حساسیت تکنیک: آنالیز مخلوط‌های مرجع ۰/۰۱ و ۰/۱ درصد (وزنی/وزنی) در ۲۰ تکرار با تکنیک TaqMan-qPCR تعریف شده و سپس تخمین درصد مرغ با استفاده از معادله خط نسبی نشان داد سطح LOD در مطالعه حاضر ۰/۰۱ درصد گوشت مرغ در ماتریکس سویا است، زیرا مقادیر Ct در ۲۰ تکرار آزمایش تا سیکل ۴۰ برای آن به دست آمد اما این مقدار به‌عنوان سطح LOQ لحاظ نگردید، زیرا این مخلوط دارای درصدهای RSD و Bias قابل‌پذیرش نبود. سطح LOQ تکنیک ۰/۱ درصد است، زیرا مقادیر ۱۱/۹۶۵ و ۰/۰۹۸- درصد برای RSD و Bias به دست آمد. بنابراین کم‌ترین غلظتی که درصدهای RSD و Bias آن در محدوده قابل‌قبول قرار دارند (به‌ترتیب ۲۵ درصد < و ۲۵ درصد $\pm$)، غلظت ۰/۱ درصد است که به‌عنوان LOQ تکنیک لحاظ گردید. Sarlak و همکاران در سال ۲۰۲۲ در مطالعه بررسی تقلبات گوشت مرغ و خمیر مرغ در همبرگرهای ادعا شده از گوشت گاو با تکنیک TaqMan-qPCR و با مدل نرمالیز شده (ΔCt)، سطح LOD و LOQ را ۰/۰۱ درصد گوشت مرغ در ماتریکس گوشت گاو تعیین کردند (۱۹)، اما Kim و Kim در سال ۲۰۱۹ با حساسیت کمتری (۰/۵ درصد) مرغ را با تکنیک Multiplex TaqMan-qPCR شناسایی کردند (۱۳).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان داد پرایمر/پروب طراحی شده از منطقه ژنی Cytb به‌درستی می‌تواند گونه مرغ را در مخلوط‌ها و برگرها شناسایی کند. همچنین با آنکه هر دو منحنی ترسیم‌شده از مدل‌های مطلق و نسبی، شاخصه‌های قابل‌قبول منحنی‌های استاندارد مختص ارزیابی‌های Real time PCR را داشتند، اما مدل نسبی نسبت به مدل مطلق به‌دلیل استفاده از کالیبراتورهای مشابه نمونه‌های آنالیز شده، درصد گوشت مرغ را با پارامترهای دقت و صحت قابل‌قبولی تخمین زد. بنابراین این مدل با حساسیت ۰/۱ درصد، می‌تواند به‌طور قابل‌اعتمادی برای اصالت‌سنجی برگرهای مرغ در سطح عرضه به کار رود.

ملاحظات اخلاقی

این طرح با کد اخلاق IR.KUMS.REC.1402.335 در تاریخ ۱۴۰۲/۰۸/۱۳ در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تصویب شده است.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد طرح ۴۰۲۰۶۱۲ استخراج شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به دلیل حمایت‌های مالی، صمیمانه قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Liu Y, Cao Y, Wang T, Dong Q, Li J, Niu C. Detection of 12 common food-borne bacterial pathogens by TaqMan real-time PCR using a single set of reaction conditions. *Front Microbiol.* 2019;10:222. doi: 10.3389/fmicb.2019.00222
2. Safdar M, Abasiyanik M. Development of fast multiplex real-time PCR assays based on EvaGreen fluorescence dye for identification of beef and soybean origins in processed sausages. *Food Res Int.* 2013;54(2):1652-6. doi: 10.1016/j.foodres.2013.09.013
3. Sarlak Z, Hosseini H, Garavand F, Mohammadi R, Rouhi M. The occurrence of lead in animal source foods in Iran in the 2010s decade: a systematic review. *Biol Trace Elem Res.* 2022;1-20. doi: 10.1007/s12011-021-02787-y

4. Spink J, Vincent Hegarty P, Fortin ND, Elliott CT, Moyer DC. The application of public policy theory to the emerging food fraud risk: Next steps. *Trends Food Sci Technol.* 2019;85:116-28. doi: [10.1016/j.tifs.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.002)
5. Hajimohammadi B, Fattahi K, Yekta ZK, Sadeghinezhad J, Morovvati H, Basti AA. Experimental study of the histological method for quantitative detection of meat in kabab and cooked sausage model. *J Vet Res.* 2020;75(3). doi: [10.22059/JVR.2022.350769.3308](https://doi.org/10.22059/JVR.2022.350769.3308)
6. Ghaderi H, Pajohi-AlaMoti MR, Kalantari-Hesari A. Investigating the fraud of using unauthorized tissues in sausages produced in Hamadan province. *J Vet Res.* 2022;77(4). doi: [10.22059/jvr.2022.350769.3308](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.350769.3308)
7. Van Ruth SM, Huisman W, Luning PA. Food fraud vulnerability and its key factors. *Trends Food Sci Technol.* 2017;67:70-5. doi: [10.1016/j.tifs.2017.06.017](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.017)
8. Kang TS. Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2019;91:574-85. doi: [10.1016/j.tifs.2019.07.037](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.037)
9. Kane DE, Hellberg RS. Identification of species in ground meat products sold on the US commercial market using DNA-based methods. *Food Control.* 2016;59:158-63. doi: [10.1016/j.foodcont.2015.05.020](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.020)
10. Amaral JS, Santos G, Oliveira MBP, Mafra I. Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. *Food Control.* 2017;72:53-61. doi: [10.1016/j.foodcont.2016.07.029](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.029)
11. Meira L, Costa J, Villa C, Ramos F, Oliveira MBP, Mafra I. EvaGreen real-time PCR to determine horse meat adulteration in processed foods. *LWT.* 2017;75:408-16. doi: [10.1016/j.lwt.2016.08.061](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.061)
12. Hossain A, Hossain MS, Munshi MK, Huque R. Detection of species adulteration in meat products and Mozzarella-type cheeses using duplex PCR of mitochondrial cyt b gene: A food safety concern in Bangladesh. *Food Chem.* 2021;2:100017. doi: [10.1016/j.fochms.2021.100017](https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100017)
13. Kim M-J, Kim H-Y. A fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of pork, chicken, and beef in commercial processed meat products. *LWT.* 2019;114:108390. doi: [10.1016/j.lwt.2019.108390](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108390)
14. Hellberg RS, Hernandez BC, Hernandez EL. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding. *Food Control.* 2017;80:23-8. doi: [10.1016/j.foodcont.2017.04.025](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.025)
15. Al Amin M, Mahfujur Rahman M, Razimi MSA, Chowdhury ZZ, Hussain MNM, Desa MNM. Screening of commercial meat products from supermarket chains for feline derivatives using SP-PCR-RLFP and lab-on-a-chip. *J Food Compos Anal.* 2020;92:103565. doi: [10.1016/j.jfca.2020.103565](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103565)
16. Salehi A, Shariatifar N, Pirhadi M, Zeinali T. An overview on different detection methods of saffron (*Crocus sativus* L.) adulterants. *J Food Meas and Charact.* 2022;16(6):4996-5006. doi: [10.1007/s11694-022-01586-w](https://doi.org/10.1007/s11694-022-01586-w)
17. Kang TS, Tanaka T. Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real-time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products. *Food Chem.* 2018;269:549-58. doi: [10.1016/j.foodchem.2018.06.141](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.141)
18. Druml B, Grandits S, Mayer W, Hocheegger R, Cichna-Markl M. Authenticity control of game meat products – A single method to detect and quantify adulteration of fallow deer (*Dama dama*), red deer (*Cervus elaphus*) and sika deer (*Cervus nippon*) by real-time PCR. *Food Chem.* 2015;170:508-17. doi: [10.1016/j.foodchem.2014.08.048](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.048)
19. Sarlak Z, Shojaee-Aliabadi S, Rezvani N, Hosseini H, Rouhi M, Dastafkan Z. Development and validation of TaqMan real-time PCR assays for quantification of chicken adulteration in hamburgers. *J Food Compos Anal.* 2022;106:104302. doi: [10.1016/j.jfca.2021.104302](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104302)
20. Druml B, Mayer W, Cichna-Markl M, Hocheegger R. Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. *Food Chem.* 2015;178:319-26. doi: [10.1016/j.foodchem.2015.01.003](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.003)
21. Kim M-R, Kwon K, Jung Y-K, Kang TS. A rapid real-time PCR method to differentiate between mottled skate (*Beringraja pulchra*) and other skate and ray species. *Food Chem.* 2018;255:112-9. doi: [10.1016/j.foodchem.2018.02.056](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.056)
22. Longato E, Lucas-González R, Peiretti PG, Meineri G, Pérez-Alvarez JA, Viuda-Martos M, et al. The effect of natural ingredients (amaranth and pumpkin seeds) on the quality properties of chicken burgers. *Food Bioprocess Technol.* 2017;10:2060-8. doi: [10.1007/s11947-017-1978-0](https://doi.org/10.1007/s11947-017-1978-0)
23. Mikhail W, Sobhy H, Khallaf M, Ali HM, El-askalany SA, El-Din MME. Suggested treatments for processing high nutritive value chicken burger. *Ann Agric Sci.* 2014;59(1):41-5. doi: [10.1016/j.aos.2014.06.006](https://doi.org/10.1016/j.aos.2014.06.006)

24. Hasan S, Khanjari A, Koohi MK, Nasrabadi HG, Shavisi N. Study on the effect of chitosan coating incorporated with *Ziziphora Clinopodioides* essential oil on the some microbial and sensory properties of chicken fillet at refrigerated temperature. J Vet Res. 2019;74(3):370-8. doi: [10.22059/JVR.2018.244342.2715](https://doi.org/10.22059/JVR.2018.244342.2715)
25. Soares S, Mafra I, Amaral JS, Oliveira MBP. A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. Int J Food Sci Technol. 2010;45(12):2581-8. doi: [10.1111/j.1365-2621.2010.02421.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02421.x)
26. Sarlak Z, Rezvani N, Rouhi M, Shojaei-Aliabadi S, Hosseini H. A normalized model based on Taqman real-time PCR assay for quantitative comparison of chicken adulteration in raw and heat-treated hamburgers. J Food Meas and Charact. 2023;17(5):4991-9. doi: [10.1007/s11694-023-02005-4](https://doi.org/10.1007/s11694-023-02005-4)
27. Alikord M, Momtaz H, Keramat J, Kadivar M, Rad AH. Species identification and animal authentication in meat products: a review. J Food Meas and Charact. 2018;12:145-55. doi: [10.1007/s11694-017-9625-z](https://doi.org/10.1007/s11694-017-9625-z)
28. Kesmen Z, Yetiman AE, Şahin F, Yetim H. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using Real-Time PCR Assays. J Food Sci. 2012;77(2):167-73. doi: [10.1111/j.1750-3841.2011.02536.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02536.x)
29. Fajardo V, González I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T, et al. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. Meat Sci. 2008;79(2):289-98. doi: [10.1016/j.meatsci.2007.09.013](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.013)
30. Lopparelli RM, Cardazzo B, Balzan S, Giaccone V, Novelli E. Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. J Agric Food Chem. 2007;55(9):3429-34. doi: [10.1021/jf0637271](https://doi.org/10.1021/jf0637271)