

## Rapid identification of sheep species (*Ovis aries*) in meat samples using isothermal amplification method

Amir Memarian<sup>1</sup>, Mohsen Golabi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>MSc Graduate in Microbial Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Iran, Email: m.golabi@bio.ui.ac.ir

---

### Article Info

**Article type:**  
Research Full Paper

**Article history:**  
Received: 2024-10-05  
Revised: 2024-11-27  
Accepted: 2024-12-11

**Keywords:**  
LAMP  
Meat Fraud  
PCR  
Rapid Detection  
Sheep meat

---

### ABSTRACT

**Background and objectives:** With the rising consumption of meat products, incidents of meat adulteration have become more prevalent and universal. One common form of adulteration is the substitution of lower-value red meats, such as goat or beef, for more valuable species such as sheep meat. Consequently, there is a growing demand for rapid and accurate methods to identify meat species. While common methods such as ELISA and PCR are valuable tools for species identification, there is a need for faster methods that can be performed on-site due to the short production and consumption chain of meat products. In this study, we employed loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the specific identification of sheep meat. Four primers were designed to target the mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene. The specificity and detection limit of these primers were evaluated and compared to the standard PCR method, which is more common in food control laboratories.

**Material and Methods:** In this study, a set of four LAMP primers targeting the Cyt b gene was designed using Primer Explorer online software for the specific identification of sheep meat samples. Genomic DNA was extracted from raw tissue samples using the NaOH method (Alkaline lysis) and used in subsequent analyses. To assess primer specificity, LAMP assays were performed on a panel of target and non-target samples. Additionally, to determine the limit of detection of the designed primers and to compare the LAMP and PCR methods, both assays were conducted on a serial dilution of sheep DNA. Finally, to optimize the diagnostic kit for field conditions, results were visualized using SYTO 24 dye.

**Results:** The results demonstrated that the designed LAMP primers were highly specific in identifying sheep meat from other non-target species. Moreover, the developed assay exhibited exceptional sensitivity, detecting as little as 17.1 pg/ $\mu$ L of sheep extracted DNA within 30 minutes of sampling, which represents a ten-fold increase in sensitivity compared to the conventional PCR method. Additionally, the use of SYTO 24 dye confirmed the feasibility of employing this method in field conditions, as the lower PCR product

---

---

yield compared to LAMP renders SYTO 24 visualizations challenging in PCR assays.

**Conclusion:** Due to its simplicity and ease of equipment use, high sensitivity, specific function between close species, and short reaction time, this method holds significant potential for detecting meat adulteration, particularly in remote locations with limited laboratory access and educated personnel.

---

---

**Cite this article:** Memarian, A., Golabi, M. 2025. Rapid identification of sheep species (*Ovis aries*) in meat samples using isothermal amplification method. *Food Processing and Preservation Journal*, 16(4), 63-78.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/fppj.2024.22843.1840

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

---

---

### شناسایی سریع گونه گوسفند (*Ovis aries*) در نمونه گوشت با استفاده از روش تکثیر هم‌دما

امیر معاریان<sup>۱</sup>، محسن گلابی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، ایران، رایانامه: m.golabi@bio.ui.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
<b>نوع مقاله:</b> مقاله کامل علمی-پژوهشی	<b>سابقه و هدف:</b> با افزایش مصرف فرآورده‌های گوشتی، موارد تقلب در گوشت فراگیرتر شده است. یکی از اشکال رایج تقلب، جایگزینی گوشت‌های قرمز کم‌ارزش، مانند گوشت بز یا گاو، به جای گونه‌های با ارزش‌تر مانند گوشت گوسفند است. در نتیجه، تقاضای فزاینده‌ای برای روش‌های سریع و دقیق برای شناسایی گونه‌های گوشتی وجود دارد. در حالی که روش‌های رایجی مانند ELISA و PCR، ابزار ارزشمندی برای شناسایی گونه‌ها هستند، به علت کوتاهی زنجیره تولید و مصرف، نیاز به روش‌های سریع‌تر قابل انجام در محل وجود دارد. در این پژوهش، ما از روش تکثیر هم‌دما با واسطه حلقه (LAMP) برای شناسایی اختصاصی گوشت گوسفند استفاده کردیم. مجموعه‌ای از چهار پرایمر برای هدف قرار دادن ژن سیتوکروم b میتوکندریایی (Cytb) طراحی شد. اختصاصیت و حد تشخیص این پرایمرها با روش استاندارد PCR که بیشتر در آزمایشگاه‌های کنترل مواد غذایی متداول است، بررسی و مقایسه شد.
<b>واژه‌های کلیدی:</b> تقلبات گوشتی تشخیص زودهنگام گوشت گوسفند LAMP PCR	<b>مواد و روش‌ها:</b> در این پژوهش برای شناسایی اختصاصی نمونه‌ی گوشت گوسفند، با استفاده از نرم‌افزار Primer Explorer، مجموعه‌ی ۴ عددی از آغازگرهای LAMP برای ژن Cyt b طراحی شد. DNA نمونه بافت‌های گوشتی با استفاده از روش NaOH استخراج و برای استفاده در مراحل بعدی بکار برده شدند. به منظور تعیین اختصاصی بودن آغازگرها، آزمون LAMP برای پنل نمونه‌های هدف و غیر هدف انجام شد. همچنین به منظور تعیین حد تشخیص آغازگرهای طراحی شده و مقایسه‌ی دو روش LAMP و PCR با همدیگر، دو آزمون یاد شده برای سری رقت تهیه شده از DNA گوسفند انجام و نتایج با هم مقایسه شدند. در انتها برای بهینه‌سازی کیت تشخیصی برای شرایط محیط خارج آزمایشگاهی، نتایج با رنگ SYTO 24 نیز مشخص شدند.
	<b>یافته‌ها:</b> نتایج کسب شده نشان دادند آغازگرهای اختصاصی LAMP قادر به شناسایی دقیق گوشت گوسفند از گوشت‌های غیر هدف دیگر است. همچنین روش آزمایشگاهی طراحی شده در این تحقیق قابلیت شناسایی اختصاصی DNA گوسفند به میزان $1 \mu\text{g} \text{pg}^{-1}$ در کمتر از ۳۰ دقیقه از زمان نمونه‌برداری را دارا است که این میزان، قدرت تشخیص ده برابری نسبت به

---

---

روش PCR را نشان داد. از طرفی دیگر، با استفاده از نتایج به دست آمده از بکارگیری رنگ SYTO 24، استفاده‌ی مؤثر از این روش در محیط خارج آزمایشگاه اثبات شد چراکه استفاده از این روش برای PCR به دلیل محصول کمتر نسبت به روش LAMP مقدر نیست.

**نتیجه گیری:** این روش به دلیل سادگی و سهولت تجهیزات، حساسیت بالا، عملکرد اختصاصی بین گونه‌های نزدیک و زمان واکنش کوتاه، پتانسیل قابل توجهی برای تشخیص تقلب گوشت، به ویژه در مکان‌های دور با دسترسی محدود به آزمایشگاه و پرسنل ماهر را دارد.

---

---

استناد: معماریان، امیر؛ گلابی، محسن. (۱۴۰۳). شناسایی سریع گونه گوسفند (*Ovis aries*) در نمونه گوشت با استفاده از روش تکثیر هم‌دما. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۶ (۴)، ۶۳-۷۸.



© نویسندگان.

DOI: 10.22069/fppj.2024.22843.1840

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

---

---

## مقدمه

گوشت یکی از مهم‌ترین منابع اصلی تغذیه برای انسان و منبع غنی از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی است (۱). با افزایش درصد جمعیت شهرنشین در دهه‌های اخیر تقاضا برای گوشت و محصولات فرآوری شده گوشتی به‌طور پیوسته روند افزایشی نشان داده است. در جوامع امروزی، کنترل کیفیت مواد غذایی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. تقلبات یکی از مواردی است که کیفیت مواد غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برخی تولیدکننده‌های مواد غذایی ممکن است با انگیزه کسب منافع مالی دست به انجام چنین اقداماتی بزنند (۲). گوشت خام و فرآورده‌های آن به علت ارزش مالی زیاد و گردش اقتصادی بالایی که دارند بیشتر در معرض تقلبات قرار می‌گیرند. یکی از تقلبات رایج در صنایع غذایی استفاده از گوشت‌های با ارزش اقتصادی پایین‌تر نظیر گوشت گاو و بز به جای گوشت‌های با ارزش بالاتر مانند گوشت گوسفند می‌باشد. از این رو تأیید گونه گوشتی در مواد غذایی مصرف‌کننده‌ها به دلایل مذهبی و مالی مهم است (۳). به همین دلیل آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت مواد غذایی از روش‌های مختلف برای تشخیص گونه‌های گوشتی استفاده می‌کنند.

تا به حال روش‌های آنالیزی بسیاری برای شناسایی تقلبات گوشتی ایجاد شده‌اند. از جمله می‌توان به آزمایش‌های مستقیم بافت‌شناسی، شناسایی پروتئین مبتنی بر روش‌های ایمونولوژیک و تکنیک‌های مبتنی بر DNA اشاره کرد. به‌طور معمول روش‌های مبتنی بر شناسایی پروتئین‌ها مثل روش الایزا (ELISA<sup>1</sup>) به علت ساده و ارزان بودن شهرت خاصی برای خود کسب کرده‌اند (۴). هرچند که دنا تورا سیون پروتئین‌ها تحت شرایط گرمایی شدید مانند فرایندهای تولید

فرآورده‌های گوشتی فرآوری شده<sup>۲</sup> باعث می‌شوند که دقت این دست از روش‌ها کاهش پیدا کند (۵ و ۶). برخلاف پروتئین‌ها و پپتیدها، DNA پایداری بیشتری در برابر شرایط پرتنش نظیر گرمای زیاد و مواد شیمیایی دارد (۷, ۸). بنابراین روش‌های مبتنی بر شناسایی DNA برتری نسبی به باقی روش‌ها دارند. در این بین روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراس<sup>۳</sup> (PCR) به علت داشتن حساسیت و دقت شناسایی بالا در شناسایی گونه‌های گوشتی، به محبوبیت خاصی دست پیدا کرده است (۹ و ۱۰). ضمن این که با استفاده از این روش امکان شناسایی چندگانه<sup>۴</sup> و در زمان واقعی<sup>۵</sup> گونه‌های گوشتی وجود دارد (۱۱ و ۱۲). با این حال روش PCR روشی وقت‌گیر، هزینه‌بر و پیچیده است. همچنین انجام آن نیازمند تجهیزات و افراد دارای تخصص‌های آزمایشگاهی است (۱۳). از آنجاکه زنجیره تولید به مصرف گوشت و محصولات آن بسیار کوتاه است بنابراین روش‌های سریع شناسایی تقلبات گوشتی مورد نیاز و ضروریست. ابداع روش‌های تکثیر DNA در دمای ثابت روشی نوین و کارآمد برای طراحی تست‌های تشخیصی سریع است که قابلیت انجام در خارج از آزمایشگاه و در محل مورد نیاز را فراهم می‌کند. تاکنون چندین روش تکثیر DNA در دمای ثابت ابداع شده است که در بین آن‌ها روش تکثیر هم‌دمای به‌واسطه حلقه (LAMP) که توسط Notomi و همکاران در سال ۲۰۰۰ معرفی شد، به‌طور گسترده برای آزمایش‌های تشخیصی سریع مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴ و ۱۵). از مزایای این روش می‌توان به دقت، حساسیت و سرعت بالای آن اشاره کرد. ضمن این که برای انجام واکنش به دستگاه ترموسایکلر نیاز نیست و تنها با یک منبع تأمین کننده

2. Processed meat products
3. Polymerase Chain Reaction
4. Multiplex
5. Real-Time

1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

سعی شد تا با استفاده از رنگ‌های متصل شونده به DNA بکارگیری کیت طراحی شده در شرایط خارج آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی نمونه و استخراج DNA:** نمونه گوشت‌های زیر از فروشگاه‌های موجود در شهر اصفهان تهیه گردید: گوسفند (*Ovis aries*)، گاو (*Bos taurus*)، مرغ (*Gallus gallus*) و بز (*Capra hircus*). میزان ۵۰ میلی‌گرم از هر گوشت برای آزمایش به‌کاربرده شد. نمونه‌ها با استفاده از تیغ جراحی ضدزنگ هموژنیزه شدند. استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از روش قلیایی با اندکی تغییرات انجام شد (۲۴ و ۲۵). مقدار ۵۰۰ μl از سدیم هیدروکسید ۰/۵ M به نمونه هموژنیزه اضافه شد، نمونه برای ۳۰ ثانیه ورتکس شد و سپس برای ۱۰ دقیقه در حمام خشک (KIAGEN، ایران) با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها بعد از ۲۰ ثانیه ورتکس برای مدت ۵ دقیقه با شتاب ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ (SIGMA، آلمان) شد. در نهایت ۱۰۰ μl از محلول رویی به لوله‌ی جدیدی انتقال یافت و به آن ۱۰۰ μl از محلول بافر Tris-HCl (pH = ۸) اضافه شد. سپس با استفاده از حجم مساوی از محلول کلروفورم ایزوآمیل الکل (۱:۲۴)، جداسازی بیشتر پروتئین‌ها انجام و در نهایت برای اندازه‌گیری میزان DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ One C (Thermo fisher، ایالات متحده آمریکا) استفاده گردید (۲۶).

**طراحی آغازگر LAMP:** برای شناسایی اختصاصی نمونه گوسفند، توالی DNA میتوکندری نژادهای مختلف گونه گوسفند از بانک ژن NCBI گردآوری شدند (MW677305.1، MW677303.1، MW677301.1، MW677299.1، MW677297.1 و MW677274.1). هم‌تراز سازی چند توالی با استفاده

دمای ثابت انجام‌پذیر است (۱۶). همچنین لازم به ذکر است که LAMP محصول ۵۰ برابری نسبت به PCR تولید می‌کند به طوری که در یک واکنش با حجم ۲۵ μl واکنش LAMP حدود ۱۰ mg در برابر ۰/۲ mg واکنش PCR معمولی محصول تولید می‌کند (۱۷). در این پژوهش برای ژن سیتوکروم b گوسفند یک مجموعه‌ی ۴ عددی از آغازگرها طراحی شد. علت انتخاب این ژن میزان بالای بروز جهش در آن است چراکه باعث سهولت در طراحی اختصاصی پرایمر برای یک‌گونه خاص می‌شود. پیش‌از این برای شناسایی گوشت گوسفند آغازگرهای LAMP برای ناحیه D-loop میتوکندری طراحی شده است (۱۸-۲۰).

تاکنون از DNA میتوکندری<sup>۱</sup> (mtDNA) به‌طور گسترده برای شناسایی گونه‌های گوشتی استفاده شده است؛ چراکه به نسبت در فرایندهای پردازش گوشت و حرارت از آسیب در امان می‌ماند (۲۱). توالی‌های mtDNA به دلایل مختلفی به جای DNA ژنومی برای شناسایی اختصاصی گونه‌ها استفاده می‌شوند. تعداد کپی mtDNA در هر سلول بسیار زیاد است (حدود ۱۰۰۰ کپی) (۲۲) و به نسبت در برابر شرایط استرس محیطی نظیر حرارت، نمک و فشار مقاوم است. به‌علاوه به علت نرخ بالای جهش‌ها در ژنوم آن امکان تفکیک گونه‌های نزدیک به هم وجود دارد (۲۳).

در این پژوهش به‌منظور توسعه یک روش تکثیر هم‌دما به‌واسطه حلقه برای شناسایی سریع گوشت گوسفند نژاد ایرانی، آغازگر اختصاصی LAMP برای نواحی حفاظت شده در ژن سیتوکروم b (Cyt b) میتوکندری گوسفند طراحی شد و نتایج و عملکرد این روش آزمایشی با روش PCR به‌عنوان یک روش استاندارد طلایی مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین

1. Mitochondrial DNA
2. Cytochrome b

از سیستم روپس دهنده به خط MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp>) انجام شد. برای ناحیه اختصاصی ژن سیتوکروم b (Cyt b) با استفاده از نرم افزار Primer Explorer version 5 یک مجموعه آغازگر طراحی گردید. مجموعه آغازگرها شامل دو توالی آغازگر رفت و دو توالی آغازگر برگشت می شود که مشخصات آنها در جدول ۱ ذکر شده اند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای LAMP و موقعیت های آنها بر روی ژن سیتوکروم b (CYTB)

موقعیت در ژن Cyt b	توالی	آغازگر
Position in the Cyt b gene	Sequence	Primer
604 - 622	GAAACAGGATCCAACAACC	F3
799 - 820	AGTATCATTTCAGGTTTGATGTG	B3
(641 - 662) F2, (690 - 714) F1	GATGAGGATTAGTAGGATAGCACCT- ACACAGATAAAATTCCCTCCA	FIP
(781 - 798) B2, (716 - 740) B1	TCATGCTACTAGTACTATTCACGCC- AGGGGGAGTGTTAAGTGG	BIP

جدول ۳ انجام شد و محصولات تا زمان مشاهده نتیجه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور بررسی صحت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز، الکتروفورز محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد. در نمونه های مثبت مشاهده یک باند تکثیر شده با اندازه قطعه ۲۱۸ نوکلئوتیدی بارنگ آمیزی توسط Safe Stain 1X (سیناکلون، ایران) زیر اشعه UV مورد تأیید قرار گرفت.

**واکنش Real-time PCR:** در این پژوهش از روش PCR به عنوان یک روش استاندارد به منظور ارزیابی میزان حساسیت روش LAMP طراحی شده بهره گرفته شد. از پرایمرهای بیرونی (F3 و B3) طراحی شده در واکنش LAMP برای این هدف استفاده شد. واکنش PCR در حجم کلی ۲۰ µl انجام شد که جزییات مخلوط واکنش در جدول ۲ ذکر شده است. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Thermo fisher، ایالات متحده آمریکا) طبق برنامه ی حرارتی

جدول ۲- جزییات مخلوط واکنش PCR

Table 2. Details of the PCR reaction mixture

حجم (µl) (غلظت (nM))	اجزای تشکیل دهنده
Volume(µl) (concentration(nM))	Components
10	qPCR 2X Mastermix (Ampliqon, دانمارک)
0.5 (250)	هر آغازگر (each primer)
7	آب (water)
2	نمونه (sample)
20	حجم کل (total volumme)

جدول ۳- برنامه حرارتی واکنش PCR

Table 3. Thermal program of the PCR reaction

زمان (Time)	دما (Temperature)	مرحله (step)
15'	95 °C	واسرشت سازی اولیه (Primary Denaturation)
30''	95 °C	واسرشت سازی ثانویه (Secondary Denaturation)
40''	59 °C	اتصال آغازگرها (Primer Annealing)
30''	72 °C	بسط آغازگرها (Primer Elongation)
5'	72 °C	گسترش نهایی (Final Elongation)

۳۵  
سیکل  
35 cycles

نارنجی قابل تفکیک هستند. به منظور تأیید دوباره نتایج، ژل آگاروز ۲ درصد (Lonza-biosciences، ایالات متحده آمریکا) با رنگ Safe-stain 1X (سیناکلون، ایران) ساخته شد و ۵ µl از محصول واکنش بر روی ژل بارگذاری شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۹۰ ولت در بافر تریس استات EDTA (TAE) IX الکتروفورز شدند و نتایج با اشعه UV مورد بررسی قرار گرفته و تصویر تهیه گردید.

آزمون اختصاصی بودن واکنش LAMP: برای ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای LAMP، ۳ نمونه از گوشت‌های خوراکی مختلف شامل گوشت گاو، بز و مرغ در کنار گوشت گوسفند در واکنش شرکت داده شدند. تمامی مراحل استخراج DNA و انجام تست LAMP برای نمونه‌های ذکر شده مشابه با نمونه اصلی انجام گرفت.

آزمون تعیین حد تشخیص واکنش LAMP و مقایسه با واکنش PCR: به منظور مقایسه حساسیت دو روش PCR و LAMP، با استفاده از بافر PBS از نمونه DNA استخراج شده از گوشت گوسفند سریال رقت (تا  $10^{-8}$ ) تهیه و به صورت موازی در هر دو روش آزمایشی LAMP و PCR استفاده شد.

واکنش **Real-time LAMP**: مخلوط واکنش LAMP طبق پژوهش انجام شده توسط گلابی و همکاران در سال ۲۰۲۱ (۲۷)، به شرح زیر تهیه شد: آغازگرهای LAMP (جدول ۱) با غلظت‌های نهایی ۰/۲ µM از هر کدام F3/B3 و ۱/۶ µM از هر کدام FIP/BIP، بتائین ۰/۵ M، بافر تکثیر در دما ثابت 1X (NewEngland BioLabs Inc، ایالات متحده آمریکا)، مخلوط dNTPs ۱.۴ mM و ۸ واحد آنزیم DNA پلیمراز (NewEngland BioLabs Inc) Bst2 ایالات متحده آمریکا) و ۱ µl رنگ SYTO 9 (Invitrogen، ایالات متحده). ۲ µl از نمونه DNA استخراج شده به ۱۸ µl از مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ثابت ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و به دنبال آن تحت اثر دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه، آنزیم غیرفعال شد. به منظور تأیید انجام واکنش LAMP به صورت بصری، ۲ µl از رنگ فلورسنت SYTO24 (Invitrogen، ایالات متحده آمریکا) با غلظت نهایی ۱۰۰ µM به مخلوط واکنش اضافه شد و با چشم غیرمسلح نتایج مشاهده شدند. تیوب‌های حاوی مخلوط واکنش مثبت با رنگ سبز روشن از تیوب‌های واکنش منفی با رنگ



نتایج و بحث

این روش برای استخراج حداکثری DNA از نمونه‌های گوشتی است. باین حال مقادیر نسبتاً کم نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۳۰ نشان دهنده‌ی وجود ناخالصی پروتئینی و نمکی در نمونه استخراج شده است.

کیفیت DNA استخراجی از نمونه‌های گوشتی: میزان و کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌ی گوشتی در جدول شماره ۴ ذکر شده است. میزان بالای DNA استخراج شده ( $1695 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) نشان‌دهنده کارآمدی

جدول ۴- میزان و کیفیت DNA استخراج شده

Table 4. Amount and quality of the extracted DNA

A260/A230	A260/A280	ng $\mu\text{l}^{-1}$	نمونه Sample
1/53	1/72	1695/7	گوشت گوسفند Sheep meat
1/65	1/77	1719/3	گوشت گاو Cow meat
1/32	1/78	1450/6	گوشت بز Goat meat
1/54	1/65	1257/2	گوشت مرغ Chicken meat

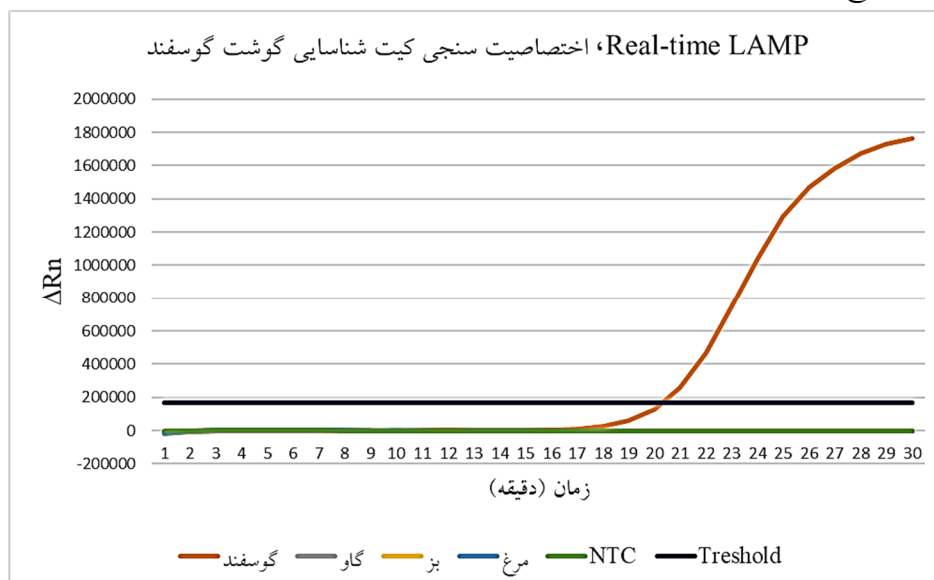
۲۰۱۸ (۲۴) برای نمونه سلامی بوقلمون تونسسی با استفاده از روش مشابه، مقدار DNA ۳۷۵ ng استخراج کردند. آن‌ها همچنین برای نسبت A260/A280 میزان ۱/۶۸ دست یافتند که تقریباً مشابه نسبت‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش است.

**بررسی اختصاصی بودن آزمون LAMP:** به‌منظور اطمینان از عملکرد اختصاصی پرایمرهای طراحی شده نسبت به گونه گوسفند، واکنش برای گونه‌های نزدیک و رایج گوشت خوراکی شامل گوشت گاو، بز و مرغ نیز انجام شد که در شکل ۱ نمودار آزمون Real-time LAMP آورده شده همچنین نتیجه‌ی آزمون با دو روش بصری (به‌کارگیری رنگ SYTO24) و انجام الکتروفورز نیز بررسی شدند (شکل ۲). در روش بصری نتایج مثبت از نتیجه‌ی منفی با چشم غیر مسلح قابل تفکیک است. همانگونه که در شکل ۲ (الف) نشان داده شده، نتیجه‌ی واکنش تنها در لوله حاوی نمونه گوشت گونه گوسفند مثبت است. به‌منظور تأیید نتایج روش بصری، محصول آزمایش روی ژل آگاروز

با توجه به هدف این پژوهش که معرفی یک آزمایش سریع به‌منظور شناسایی گونه گوشت است. روش ساده، کم‌هزینه و سریع استفاده از NaOH و حرارت برای استخراج DNA از نمونه به کار گرفته شد. هرچند که نمونه‌ها حاوی مقادیر ناخالص‌های پروتئینی و نمکی برای انجام آزمایش‌های حساس مولکولی توصیه نمی‌شود اما این ناخالصی تأثیری در آزمایش تعیین گونه گوشتی با روش PCR و LAMP نداشته و روش به کار گرفته شده برای به‌کارگیری در این دو روش به میزان کافی کارآمد است. در مطالعات مشابه (۲۴، ۲۵) نیز از این روش استخراج برای آزمون‌های PCR و LAMP استفاده شده است. در پژوهش مونیکا و همکاران در سال ۲۰۲۱، با استفاده از روش تا حدودی مشابه برای نمونه‌های گوشت خام گوسفند، گاو و مرغ به‌ترتیب میزان  $205/50 \text{ ng}$  و  $170/66 \text{ ng}$  DNA استخراج کردند که نسبت جذب A260/A280 آن‌ها در بازه‌ای بین ۱/۶ تا ۱/۸ قرار داشت (۱۹). گرگوری و همکاران در سال

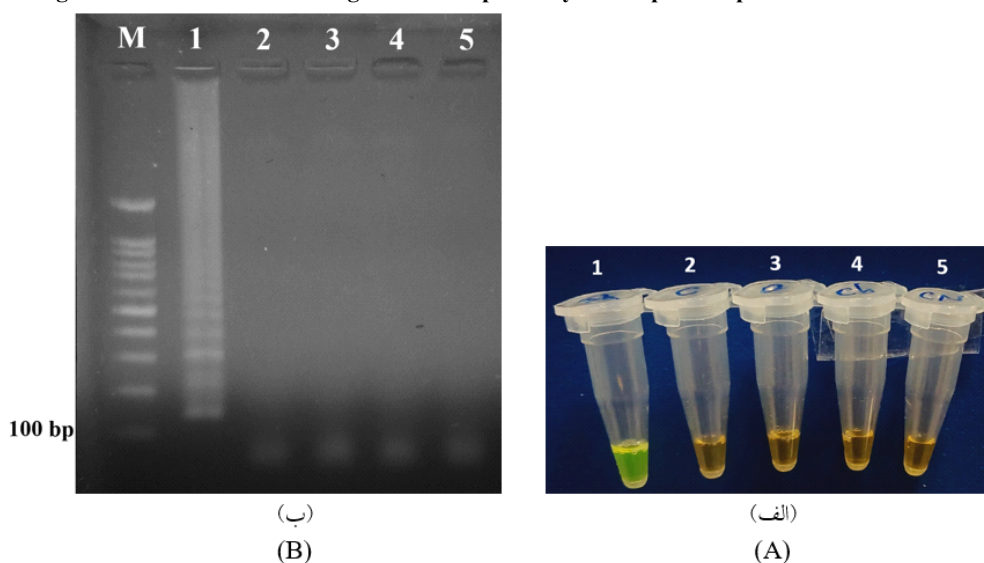
بصری و نمودار Real-time LAMP یکسان و تأیید کننده‌ی اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده است.

الکتروفورز بارگذاری شد که نتایج در شکل ۲ (ب) نشان داده شده است که ظهور نوار اسمیری به همراه الگوی نردبانی در انتهای آن نشان دهنده انجام واکنش LAMP است. نتایج حاصل از این روش با روش



شکل ۱- نمودار Real-time LAMP اختصاصیت سنجی کیت شناسایی گونه گوشتی گوسفند

Figure 1. Real-time LAMP diagram of the specificity of sheep meat species identification kit



شکل ۲- نتایج آزمون تعیین اختصاصی بودن کیت شناسایی گوشت گوسفند با استفاده از: الف) تشخیص بصری با رنگ SYTO 24 ب) الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪: شماره ۱ تا ۵ به ترتیب نمونه‌های گوشتی گوسفند، گاو، بز، مرغ و کنترل منفی است. M: نشانگر با طول قطعه حداقل ۱۰۰ bp.

Figure 2. The results of the test to determine the specificity of the sheep meat identification kit using: a) visual detection with SYTO 24 dye b) electrophoresis on 2% agarose gel: numbers 1 to 5, respectively, of sheep, cow, goat, chicken and Negative control. M: a marker with a fragment length of at least 100 bp.

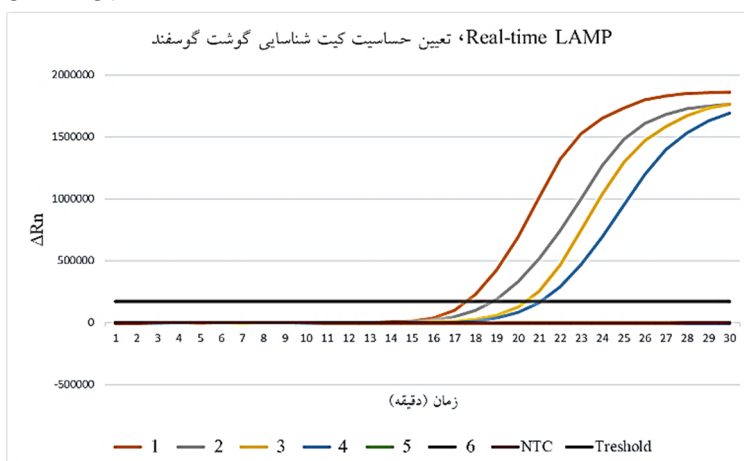
نیاز به اتصال صحیح شش ناحیه پرایمری در واکنش LAMP نسبت به واکنش PCR که از دو ناحیه پرایمری بهره می‌گیرد باعث افزایش نرخ توانایی

برای انجام واکنش LAMP، به حداقل دو جفت آغازگر رفت و برگشت نیاز است که در مجموع توانایی شناسایی ۶ جایگاه اتصال بر روی ژن هدف را دارند.

تعیین حد تشخیص آغازگرهای LAMP و مقایسه آن با واکنش PCR: به منظور تعیین حد تشخیص آغازگرهای LAMP طراحی شده، نمونه DNA استخراج شده از گوشت گوسفند حاوی  $1 \mu\text{l}^{-1}$  ng DNA تا  $10^8$  مرتبه با بافر PBS رقیق شد و از رقت  $10^{-3}$  تا  $10^{-8}$  در واکنش LAMP شرکت داده شدند (شکل ۳). همچنین به منظور مقایسه حد تشخیص دو واکنش LAMP و PCR، واکنش PCR Real-time برای سری رقت مشابه واکنش LAMP با استفاده از دو آغازگر بیرونی B3 و F3 انجام شد (شکل ۴). همانطور که در نمودار Real-time LAMP (شکل ۳) مشخص است، حد تشخیص کیت شناسایی تا رقت  $10^{-6}$  از نمونه برابر با حدود  $170 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$  در نظر گرفته می شود که این میزان در مدت زمان ۲۱ دقیقه از زمان شروع واکنش شناسایی شد که در مقابل، این میزان برای واکنش PCR تا رقت  $10^{-5}$  برابر با حدود  $17 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$  بود که با توجه به نمودار شکل ۴ در مدت ۱ ساعت (۲۷ سیکل) از زمان آغاز واکنش این نتیجه به دست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده، به حد تشخیص ۱۰ برابری روش LAMP نسبت به PCR در زمان کوتاه تر پی برده می شود.

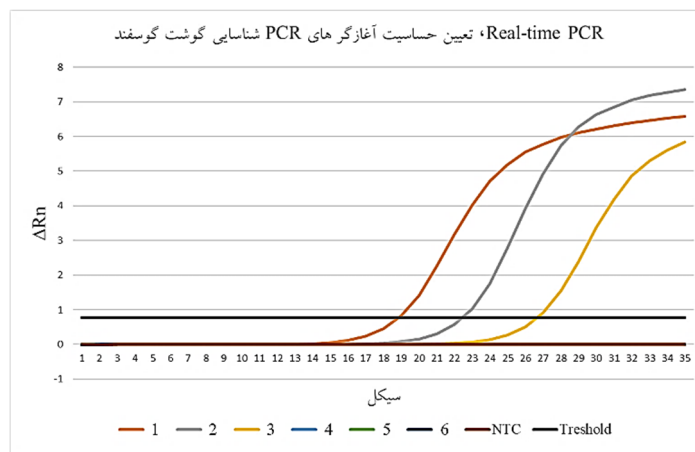
اختصاصی بودن آغازگرهای LAMP نسبت به آغازگرهای PCR می شود. به طور میانگین طول ۲۰ نوکلئوتیدی برای هر جایگاه اتصال پرایمری طراحی می شود در نتیجه در آزمایش LAMP در مجموع در حدود ۱۲۰ نوکلئوتید از ژن هدف را توسط پرایمرها پوشش می دهد که این امر باعث شده که پتانسیل اختصاصی بودن واکنش LAMP بیشتر از واکنش PCR باشد (۲۸).

رنگ‌هایی از قبیل SYBR Green I و SYTO 24 به طور معمول برای رنگ آمیزی DNA استفاده می شوند که پس از اتصال به دو رشته DNA قابلیت انتشار نور فلورسنت در آن‌ها به شدت افزایش می یابد. یک مزیت آزمون LAMP تولید حدود پنجاه برابری محصول DNA دو رشته‌ای در مقایسه با آزمون PCR است (۲۹). در نتیجه این میزان بالای محصول، قابلیت تفکیک بصری نتایج مثبت از نتیجه منفی در واکنش LAMP در حضور رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA همچون SYTO 24 را فراهم می سازد. این امر مشاهده نتایج آزمون را از انجام الکتروفورز بی نیاز ساخته و باعث کاهش زمان دستیابی به نتیجه برای واکنش LAMP می گردد.



شکل ۳ - نمودار Real-time LAMP تعیین حساسیت کیت شناسایی گوشتی گوسفند. شماره ۱ تا ۶ به ترتیب: شماره ۱ ( $1.7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ), شماره ۲ ( $170 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), شماره ۳ ( $17 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), شماره ۴ ( $1.7 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), شماره ۵ ( $170 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ ), شماره ۶ ( $17 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ ) و NTC نمونه منفی.

Figure 3. Real-time LAMP diagram of the sensitivity of sheep meat species identification kit. Number 1 to 6 respectively: No. 1 ( $1.7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 2 ( $170 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 3 ( $17 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 4 ( $1.7 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 5 ( $170 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ ) and negative control sample.

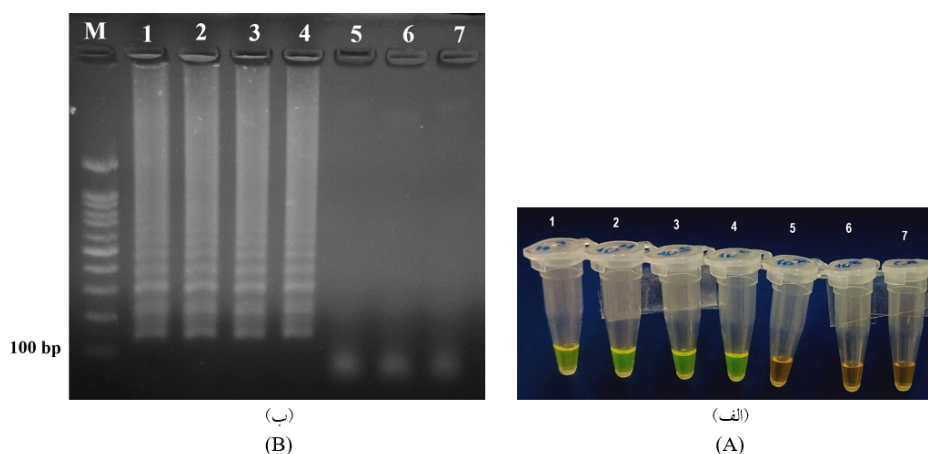


شکل ۴- نمودار Real-time PCR تعیین حساسیت آغازگرهای PCR شناسایی گونه‌ی گوشتی گوسفند. شماره ۱ تا ۶ به ترتیب: شماره ۱ (۱/۷ ng μl<sup>-1</sup>), شماره ۲ (۱۷۰ pg μl<sup>-1</sup>), شماره ۳ (۱۷ pg μl<sup>-1</sup>), شماره ۴ (۱/۷ pg μl<sup>-1</sup>), شماره ۵ (۱۷۰ fg μl<sup>-1</sup>), شماره ۶ (۱۷ fg μl<sup>-1</sup>) و NTC نمونه‌ی کنترل منفی.

**Figure 4.** Real-time PCR diagram for determining the sensitivity of PCR primers for sheep meat species identification. Number 1 to 6 respectively No. 1 (1.7 ng μl<sup>-1</sup>), No. 2 (170 pg μl<sup>-1</sup>), No. 3 (17 pg μl<sup>-1</sup>), No. 4 (1/7 pg μl<sup>-1</sup>), No. 5 (170 fg μl<sup>-1</sup>), No. 6 (17 fg μl<sup>-1</sup>) and negative control sample.

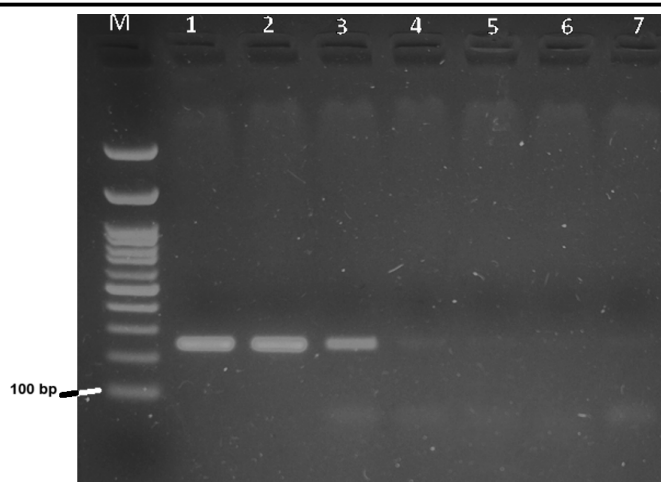
PCR با روش ژل آگارز ۲٪ (شکل ۶) مشاهده شدند.

همچنین نتایج برای واکنش LAMP با دو روش رنگ SYTO 24 و ژل آگارز ۲٪ (شکل ۵) و برای واکنش



شکل ۵- نتایج آزمون تعیین میزان حساسیت کیت شناسایی گوشت گوسفند با استفاده از: الف) تشخیص بصری با رنگ SYTO 24 ب) الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪، شماره ۱ تا ۷ به ترتیب: شماره ۱ (۱/۷ ng μl<sup>-1</sup>), شماره ۲ (۱۷۰ pg μl<sup>-1</sup>), شماره ۳ (۱۷ pg μl<sup>-1</sup>), شماره ۴ (۱/۷ pg μl<sup>-1</sup>), شماره ۵ (۱۷۰ fg μl<sup>-1</sup>), شماره ۶ (۱۷ fg μl<sup>-1</sup>) و شماره ۷ نمونه کنترل منفی. M: نشانگر با وزن ملکولی حداقل 100 bp.

**Figure 5.** The results of the test to determine the sensitivity of the sheep meat identification kit using: a) visual detection with SYTO 24 dye b) electrophoresis on 2% agarose gel, number 1 to 7 respectively No. 1 (1.7 ng μl<sup>-1</sup>), No. 2 (170 pg μl<sup>-1</sup>), No. 3 (17 pg μl<sup>-1</sup>), No. 4 (1/7 pg μl<sup>-1</sup>), No. 5 (170 fg μl<sup>-1</sup>), No. 6 (17 fg μl<sup>-1</sup>) and No. 7 negative control sample. M: a marker with a molecular weight of at least 100 bp



شکل ۶ - الکتروفورز محصول PCR مقایسه میزان حساسیت روی ژل آگاروز: محصول واکنش PCR برای سری رقت از نمونه گوسفند روی ژل آگارز ۲٪. نمونه‌ها حاوی DNA گوسفند به میزان: شماره ۱ ( $1/7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ )، شماره ۲ ( $1/70 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ )، شماره ۳ ( $1/700 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ )، شماره ۴ ( $1/7000 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ )، شماره ۵ ( $1/70000 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ )، شماره ۶ ( $1/700000 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ) و شماره ۷ نمونه کنترل منفی. M: نشانگر با وزن ملکولی حداقل ۱۰۰ bp.

**Figure 6. PCR product electrophoresis, comparison of sensitivity on agarose gel: PCR reaction product for dilution series from sheep sample on agarose gel, 2% samples containing sheep DNA in the amount: No. 1 ( $1.7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 2 ( $170 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 3 ( $17 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 4 ( $1.7 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 5 ( $170 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ ), No. 6 ( $17 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ ) and No. 7 of the negative control sample. M: a marker with a molecular weight of at least 100 bp.**

گونه‌ی گوشتی اسب را به‌طور اختصاصی شناسایی کنند (۲۰).

از این روش تاکنون برای شناسایی سایر انواع تقلبات نظیر شناسایی شیر گونه‌های مختلف جانوری استفاده شده است. دب و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۳۱) با استفاده از این روش، موفق شدند که تا مقدار ۵ درصد از تقلبات استفاده از شیر گاو در شیر بوفالو را شناسایی کنند. آن‌ها همچنین برای این کار از ناحیه‌ی D-loop ژنوم میتوکندری استفاده کردند. در نهایت، استفاده‌ی پی‌درپی محققان از ژنوم میتوکندری برای شناسایی اختصاصی گونه‌های مختلف در نمونه‌های متفاوت نشان از پتانسیل بالای این ژنوم برای شناسایی اختصاصی را دارد.

### نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر کیت شناسایی اختصاصی گوشت گوسفند بر اساس روش LAMP طراحی شد که اساس این کیت تکثیر اختصاصی ناحیه‌ای از ژن Cyt b از ژنوم میتوکندری گوسفند است. برای استخراج

در پژوهش مشابه در سال ۲۰۱۴ چو و همکاران (۲۰) برای شناسایی اختصاصی گوشت گوسفند خام با استفاده از آغازگرهای LAMP و PCR به حد تشخیص  $1 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$  و  $100 \text{ pg } \mu\text{l}^{-1}$  دست یافتند. در پژوهش دیگری در سال ۲۰۲۰، مونیکا و همکاران (۱۹) برای آغازگرهای LAMP به حد تشخیص  $0.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  دست یافتند که از حد تشخیص به‌دست‌آمده در این پژوهش غیر حساس‌تر می‌باشد.

روش LAMP برای شناسایی گونه‌های گوشتی دیگر نظیر گاو، بز، خوک و اسب نیز استفاده شده است. کوماری و همکاران در سال ۲۰۱۹ توانستند با طراحی آغازگرهای LAMP برای ناحیه‌ی D-loop ژنوم میتوکندری گاو تا میزان  $0.2 \text{ ng}$  از DNA هدف را تشخیص بدهند. همچنین در این پژوهش از رنگ SYBR Green 1 برای شناسایی در نقطه‌ی پایانی و در زیر نور معمولی استفاده شد (۳۰). چو و همکاران نیز با طراحی برای ژن ATP سنتاز زیر واحد ۶ و تشخیص حداقل میزان  $1 \text{ pg}$  از DNA هدف،

ساده و مدت‌زمان کوتاه آن قابلیت استفاده در مجتمع‌های پردازش گوشت برا شناسایی سریع آلودگی‌های گوشتی را دارا است.

### سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهش و فناوری و مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

### تضاد منافع

نویسندگان تعارض منافی برای اعلام ندارند.

DNA از روش کم‌هزینه و سریع NaOH استفاده شد. نتایج آزمایش بر روی گونه‌های غیر هدف، شناسایی اختصاصی گونه‌ی گوسفند را نشان می‌دهد. حد تشخیص به دست آمده در این روش میزان  $1 \mu\text{g}$  به دست آمد که قدرت ده برابری نسبت به روش PCR را نشان می‌دهد ضمن این که نتایج حاصل از واکنش‌های Real-time شناسایی این میزان در مدت‌زمان بسیار کوتاه‌تر نسبت به PCR را نشان می‌دهد. این روش به دلیل عدم نیازمندی به تجهیزات گران‌قیمت، امکان انجام تنها با یک بلوک حرارتی

### منابع

- Ahmad, R. S., Imran, A., & Hussain, M. B. (2018). Nutritional composition of meat. *Meat science and nutrition*, 61(10.5772), 61-75.
- Johnson, R. (2014). Food fraud and economically motivated adulteration of food and food ingredients.
- Espinoza, T., Mesa, F. R., Valencia, E., & Quevedo, R. (2015). Types of fraud in meat and meat products: a review. *Scientia agropecuaria*, 6(3), 223-233.
- 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.
- Zhu, Y., & Hsieh, Y. H. P. (2021). Effect of storage and processing on the immunodetectability of fish proteins using pooled monoclonal antibodies in ELISA and dot blot. *Food control*, 125, 107976.
- Sentandreu, M. Á., & Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International*, 60, 19-29.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. C., Dhahi, T. S., Kashif, M., ... & Abd Hamid, S. B. (2012). Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Meat science*, 91(4), 454-459.
- Hossain, M. M., Abidin, S. A. S. Z., Bujang, A., Taib, M. N., Sagadevan, S., Johan, M. R., & Nizar, N. N. A. (2023). TaqMan multiplex qPCR for detecting animal species in meat and meat products: Development, recent advances and future prospects. *Food Control*, 150, 109761.
- Nesvadbova, M., Dzedzinska, R., Hulankova, R., Babak, V., & Kralik, P. (2023). Quantification of the percentage proportion of individual animal species in meat products by multiplex qPCR and digital PCR. *Food Control*, 154, 110024.

13. McKenna, J. P., Fairley, D. J., Shields, M. D., Cosby, S. L., Wyatt, D. E., McCaughey, C., & Coyle, P. V. (2011). Development and clinical validation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Neisseria meningitidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 69(2), 137-144.
14. Mori, Y., & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*, 15(2), 62-69.
15. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
16. Bozorgmehr, A., Bodaghabadi, N., Farhangi, B., Babashah, S., & Sadeghizadeh, M. (2015). Techniques for evaluation of LAMP amplicons and their applications in molecular biology. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(17), 7409-7414.
17. Park, J. W. (2022). Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests. *Biosensors*, 12(10), 857.
18. Ma, B., Dai, M., Fang, J., Wu, Y., & Zhang, M. (2016). Visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for identification bovine and ovine gene in animal foodstuff. *American Journal of Food Technology*, 11(5), 193-203.
19. Mounika, T., Girish, P. S., Shashi Kumar, M., Kumari, A., Singh, S., & Karabasanavar, N. S. (2021). Identification of sheep (*Ovis aries*) meat by alkaline lysis-loop mediated isothermal amplification technique targeting mitochondrial D-loop region. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 3825-3834.
20. Cho, A. R., Dong, H. J., & Cho, S. (2014). Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA. *Korean journal for food science of animal resources*, 34(6), 799.
21. Elyasigorji, Z., et al., *Mitochondrial genes as strong molecular markers for species identification*. The Nucleus, 2023. 66(1): p. 81-93.
22. Koh, B. R. D., Kim, J. Y., Na, H. M., Park, S. D., & Kim, Y. H. (2011). Development of species-specific multiplex PCR assays of mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA for the identification of animal species. *Korean Journal of Veterinary Service*, 34(4), 417-428.
23. 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.
24. Gargouri, H., & Hadj Kacem, H. (2018). Evaluation of alternative DNA extraction protocols for the species determination in turkey salami authentication tests. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 733-745.
25. Girish, P.S., Haunshi, S., Vaithyanathan, S., Rajitha, R., & Ramakrishna, C. (2013). A rapid method for authentication of Buffalo (*Bubalus bubalis*) meat by Alkaline Lysis method of DNA extraction and species specific polymerase chain reaction. *Journal of food science and technology*, 50(1), 141-146.
26. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45), e2565.
27. Golabi, M., Flodrops, M., Grasland, B., Vinayaka, A.C., Quyen, T.L., Nguyen, T., ... & Wolff, A. (2021). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and on-site detection of avian influenza virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 652048.
28. Shirshikov, F. V., & Bespyatykh, J. A. (2022). Loop-mediated isothermal amplification: from theory to practice. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(6), 1159-1174.
29. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), 150-154.
30. Kumari, S., Kumar, R.R., Mendiratta, S.K., Kumar, D., Rana, P., Kumar, D., & Jawla, J. (2019). Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for

- identification of tissue of cattle origin by targeting mitochondrial gene sequences. *3 Biotech*, 9, 1-9.
31. Deb, R., Sengar, G.S., Singh, U., Kumar, S., Alyethodi, R.R., Alex, R., ... & Prakash, B. (2016). Application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of cow components adulterated in buffalo milk/meat. *Molecular biotechnology*, 58, 850-860.