

سرنوشت دی.ان.ا و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران

علیرضا ستارزاده^{۱،۲}، حسن رهنما*^۱، بهزاد قره‌یاضی^۱ و رفیعه ستارزاده^۱

۱. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

hrahnama@abrii.ac.ir

چکیده

هنگامی که یک ژن جدید به ژنوم گیاه منتقل می‌شود، به‌طور معمول نتیجه نهایی آن تولید یک یا چند پروتئین جدید است. گاهی اوقات، پروتئین‌های بیان شده در گیاهان تراریخته می‌توانند در رژیم غذایی انسان کاملاً جدید باشند. بنابراین بررسی پایداری و انتقال پروتئین و تراژن و یا قطعات حاصل از تجزیه آن‌ها در دستگاه گوارش و بافت‌های انسان و حیوانات مصرف‌کننده مسئله بسیار مهمی در ایمنی غذایی یک غذای تراریخته است. احتمال جذب قطعات دی.ان.ای موجود در غذا توسط باکتری‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال، پایداری دی.ان.ا در تمام مناطق سیستم هاضمه مورد بررسی قرار گرفته است. دستگاه گوارش حاوی انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها است. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند با جذب دی.ان.ای هضم شده و آزاد شده از غذا (در نتیجه فعالیت‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی دستگاه گوارش) تراریخته شوند. مشاهده تغییرات فنوتیپ ساختاری و عملکردی زمانی امکان‌پذیر است که ژن یا ژن‌های تغییر یافته پایدار مانده و در دستگاه رونویسی و ترجمه موجود تراریخته به پروتئین‌های کارا تبدیل شوند. هدف این گزارش مرور پژوهش‌های انجام شده در مورد سرنوشت دی.ان.ای نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش حیوانات است. پژوهش‌های انجام شده بر روی دی.ان.ا در دستگاه گوارش نشان دهنده این است که بیشتر دی.ان.ای خوراک مصرف شده به

شکل پراکنده در آمده و قابلیت تشخیص آن کاهش یافته و به انتخاب اندازه قطعه قابل تکثیر وابسته است. علاوه بر این، نتایج منعکس کننده تفاوت در روند تخریب مواد غذایی فرآوری شده در دستگاه گوارش، از دی.ان.ای بدست آمده در مدل‌های مختلف حیوانی است. تمامی گزارش‌ها سرنوشت یکسانی برای مولکول دی.ان.ا در درون دستگاه گوارش عنوان کرده‌اند، چرا که همه دی.ان.ا، از جمله دی.ان.ای موجود در موجودات تراریخته، از همان چهار نوکلئوتید یکسان تشکیل شده، به این معنی که استفاده از روش‌های نو ترکیب در تولید غذا تغییرات عمده‌ای را در خصوصیات شیمیایی دی.ان.ا ایجاد نمی‌کند و دی.ان.ای تراژن در ساختار متفاوت از دی.ان.ای معمول موجود در سلول‌های حیوان و یا گیاه نیست، تنها تفاوت در ترتیب توالی‌های رونویسی است و دلیلی برای شک کردن به اساس و عملکرد دی.ان.ای تراژن با دی.ان.ای طبیعی گیاهی برای مصرف وجود ندارد.

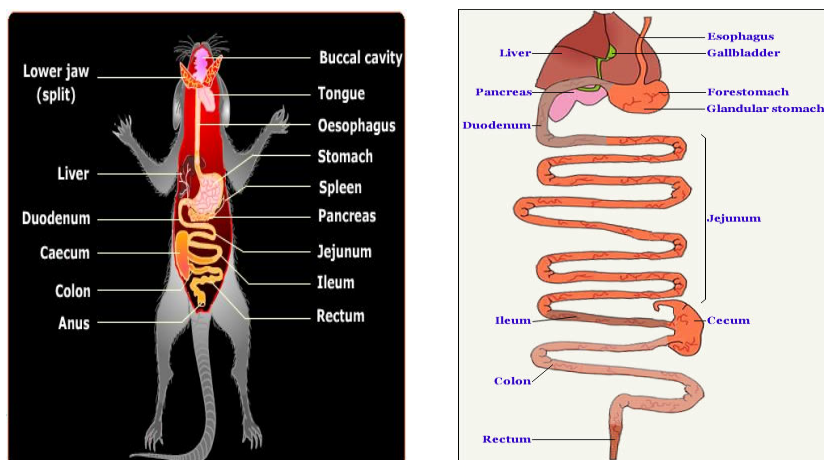
واژه‌های کلیدی: تراژن، دی.ان.ای نو ترکیب، دستگاه گوارش، مهندسی ژنتیک، گیاه تراریخته.

مقدمه

شده‌اند. یکی از موارد ضروری در مرحله رهاسازی محصولات تراریخته ارزیابی سلامت غذایی و بهداشتی این محصولات است. بدین منظور ضروری است پس از تولید یک محصول تراریخته سلامت غذایی از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد. یکی از این موارد بررسی میزان ثبات و تجزیه پذیری پروتئین یا ژن مورد نظر در طی مراحل هضم است. تجزیه کامل پروتئین یا دی.ان.ا در طی هضم می‌تواند ملاحظه‌های مربوط به سمیت یا حساسیت‌زایی آن را به حداقل برساند. ارزیابی ملاحظه‌های بیولوژیک موجودات تراریخته مربوط به چگونگی

مهندسی ژنتیک به‌عنوان یک ابزار و روش مناسب جهت بهبود صفات زراعی مانند تحمل به شرایط نامساعد محیطی، بهبود کیفیت و ارزش غذایی محصولات، کاربردهای دارویی همچنین یک راه بالقوه برای حذف آلرژن‌ها از غذاهای آلرژی‌زا شناخته شده است. در حالی که اولین نسل از محصولات تراریخته برای تغذیه انسان بیشتر برای مقاومت در برابر حشره‌کش یا علف‌کش است، نسل دوم از گیاهان تراریخته برای تولید مواد غذایی با هدف بهبود خواص بهداشتی، عملکرد و یا حتی طعم مواد غذایی تولید

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"



شکل ۱- مقایسه دستگاه گوارش انسان (سمت راست) و دستگاه گوارش موش (سمت چپ).

مزرعه‌ای بیشتر استفاده می‌شود (شکل ۱) (۳۶) و (۲۷).

مشکلات تشخیص و شناسایی دی.ان.ای

نو ترکیب

ارزیابی ملاحظه‌های احتمالی تماس دی.ان.ای تراژن موجود در جیره غذایی از نظر انتقال افقی به فلور میکروبی داخل بدن مهم است. این تماس به مقدار دی.ان.ای نو ترکیب موجود در گیاه تراریخته، مقدار مواد تراریخته مصرف شده، فرآوری و مراحل تهیه غذا و خوراک، مقدار دی.ان.ای آزاد شده از گیاه که در دسترس فلور میکروبی داخلی قرار می‌گیرد، موجود زنده مصرف کننده و در نهایت به مقدار دی.ان.ای که در طی عبور از

تخریب دی.ان.ای و یا قابلیت تخریب آن در محیط‌های مختلف از جمله در ترکیبات مختلف و در دستگاه گوارش پستانداران است (۳۷، ۲۴، ۴۱ و ۳۹).

سرنوشت تراژن و یا قطعات حاصل از تجزیه آن‌ها در دستگاه گوارش و احتمال جذب آنها در بافت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. ارزیابی اثرهای تغذیه‌ای در حیوانات مختلف مانند موش، جوجه، گربه ماهی، خوک، گاو شیری، گاو، گوسفند و در مواردی بر روی انسان انجام شده است. در بیشتر موارد به خصوص زمانی که محصول تراریخته به مصرف انسان برسد، از موش به دلیل مشابهت بسیار زیاد دستگاه گوارش آن با انسان نسبت به سایر حیوانات آزمایشگاهی و

۱- تخمیر، پختن غذا و حرارتی تا دمای بیشتر از ۹۵ درجه سانتی‌گراد باشد (۱۵). یا حرارت طولانی مدت مانند اتوکلاو در فرآیند کنسروسازی ممکن است منجر به هیدرولیز دی.ان.ا، قطعه قطعه شدن دی.ان.ا و یا تغییرات شیمیایی دی.ان.ا شوند.

۲- افزایش تغییرات شیمیایی و هیدرولیز دی.ان.ا در pH پایین (به‌عنوان مثال سرکه)، تغییرات شدید pH منجر به پورین‌زدایی و از بین رفتن پیوندهای فسفودی استری می‌شود. در طی فرآوری pH می‌تواند بین ۱ تا ۱۲ تغییر کند و بر روی پیوند بازهای آلی با قندها (هیدرولیز) و یا بر اسکلت قند-فسفات (شکستن رشته) و بازهای آلی (آمین‌زدایی) موثرند.

۳- تخریب آنزیمی دی.ان.ای توسط نوکلئازها منجر به مشکلاتی در شناسایی روش‌های تشخیصی مبتنی بر دی.ان.ا می‌شود. آنزیم‌ها مانند DNAsها، در غذاها اهمیت بالایی دارند و بر روی اسکلت قند-فسفات، بازهای اسیدنوکلئیک (هیدرولیز آنها) موثرند. به همین دلیل موارد ذکر شده و مشابه آن می‌تواند نتایج متناقضی از وجود دی.ان.ای نوترکیب را ارائه دهند (۱۶، ۵ و ۲).

دستگاه گوارش پایدار باقی می‌ماند بستگی دارد (۲). به‌نظر می‌رسد بسیاری از قطعات دی.ان.ای گیاهی خورده شده در pH پایین معده یا نوکلئازهای تولید شده در بزاق و روده کوچک به‌صورت غیرفعال در آمده یا تخریب می‌شوند (۱، ۱۱ و ۲۱). با این وجود در برخی موارد ممکن است قطعات کوچک دی.ان.ا به‌دلیل اتصال بر روی مواد معدنی یا پروتئین‌ها از تخریب در دستگاه گوارش محافظت شوند و به روده کوچک و بزرگ رسیده و در نهایت وارد محیط شوند (۱۶، ۲ و ۱۷). علاوه بر فرآیندهای گوارشی که موجب تخریب دی.ان.ا می‌شوند، روش فرآوری (آماده‌سازی مواد غذایی) به‌طور قابل توجهی در کاهش دی.ان.ای قابل تشخیص موثرند، گیاه تراریخته قبل از مصرف توسط حیوانات، تحت فرآیند تهیه خوراک دام، انبار می‌شود این کار موجب تخریب دی.ان.ا به قطعات کوچک در حدود ۲۰۰ جفت بازی می‌شود (۱۴، ۱۲، ۲۶ و ۱۶). عوامل متعددی تشخیص و شناسایی دی.ان.ای نوترکیب را به علت تخریب دی.ان.ا در محصولات فرآوری شده با مشکل مواجه می‌سازد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد.

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

پژوهش‌های بررسی پایداری دی.ان.ا در دستگاه گوارش پستانداران

سرنوشت اسیدهای نوکلئیک در دستگاه گوارش پستانداران، به‌عنوان مثال نشخوارکنندگان و موش، سال‌ها پیش برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت، که کاتابولیسم دی.ان.ا از بازهای نیتروژنی، بازهای آزاد و متابولیت‌های ثانویه مشخص شد. با این حال، با حساسیت محدود روش‌های در دسترس، نمی‌توان گفت که چقدر از قطعات دی.ان.ا به‌صورت دست نخورده می‌توانند از طریق سیستم روده پستانداران سالم عبور کند (۳۴ و ۲۹). حیوانات اهلی، مقدار قابل توجهی از دی.ان.ای خارجی را از طریق خوراک مصرف کرده و امکان انتقال دی.ان.ا از محصولات تراریخته به بافت‌های حیوانی و اندام‌ها افزایش پیدا می‌کند. بررسی جذب دی.ان.ای موجود در خوراک در حیوانات مزرعه با استفاده از روش‌های مختلف: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، دورگ‌گیری سادرن بلات (SBH)، دورگ‌گیری در محل (ISH)، فلورسنت دورگ‌گیری در محل (FISH)، در جوندگان، ماهی، مرغ، خوک، گوسفند، گاو،

حیوانات وحشی و انسان‌ها انجام شده است. پس از پژوهش‌های انجام شده و پس از شناسایی دی.ان.ای باکتریوفاژ، پلاسمید و گیاه در قطعاتی با اندازه‌های مختلف و غلظت متفاوت در دستگاه گوارش یا در سلول‌های گردش خون و اندام‌هایی مانند کبد، طحال و کلیه موش توجه به پایداری دی.ان.ای افزایش یافته است. نتایج پژوهش‌های انجام شده بر روی برخی از موجودات مختلف به‌صورت خلاصه در اینجا ذکر می‌شود.

یک گروه پژوهشی سرنوشت دی.ان.ای مصرف شده از منابع مختلف خوراک توسط جوندگان را بررسی و نشان دادند که دی.ان.ای مشتق شده از خوراک به‌طور کامل در دستگاه روده موش تخریب نمی‌شود. آن‌ها نشان دادند که ۱ تا ۲ درصد دی.ان.ای باکتریوفاژ که به‌صورت خوراکی مصرف شده بود در مجموعه دستگاه گوارش سالم مانده و در مدفوع تشخیص داده شد. اندازه قطعات دی.ان.ای تشخیصی در نمونه‌های مدفوع در بازه زمانی ۱ الی ۷ ساعت پس از خوردن غذا از چند صد جفت باز تا حدود ۱۷۰۰ جفت باز (چندین استثنا) متغیر بود (۱۹ و ۲۷). در آزمایشی دیگر تغذیه موش با ژن خاص

گیاه سویا (rubisco) در بخش‌های مختلف دستگاہ گوارش پس از ۱۲۱ ساعت، سالم می‌ماند که نشان‌دهنده پایداری بودن دی.ان.ای تغذیه شده از گیاهان نسبت به دی.ان.ای "برهنه" است (۱۹). نتایج پژوهش مشابه نشان داد که رژیم غذایی با محتوای فیبر بالا، زمان انتقال مواد غذایی در دستگاہ گوارش را کم کرده و دی.ان.ای خارجی به سرعت هضم می‌شود. افزایش میزان چربی یا سلولز در رژیم غذایی تغییری در هضم غذا نشان نمی‌دهد، اما پر بودن معده در تخریب دی.ان.ای اثرگذار بوده است. در حیواناتی که قبل از دریافت دی.ان.ای پلاسמיד گرسنه نگه‌داشته شده بودند، دی.ان.ای با سرعت بیشتری در حال تخریب بود (۲۷). در آزمایشی که طی آن تغذیه موش با دی.ان.ای نوترکیب صورت گرفت بیان mRNA و پروتئین در اندام‌های مختلف مشاهده شد (۱۹). با این حال تغذیه طولانی مدت موش به مدت ۸ نسل انتقال ژرم لاین از قطعات دی.ان.ای خورده شده را نشان نداد. در این آزمایش روزانه تقریباً ۵۰ میلی‌گرم از دی.ان.ای به موش خورانده شد. دی.ان.ای داده شده به موش‌ها که کدکننده پروتئین فلورسنت سبز (GFP) تحت کنترل یکی از سه پروموتور

قوی ویروسی RERV [سیتومگالوویروس انسانی (علیه ویروس سیتومگال) (hCMV)، سارکوم ویروس رز (RSV) و یا ویروس میمون (SV-40)] بودند. در آزمایش‌های جداگانه‌ای که با رویکرد استفاده در "ژن درمانی" انجام شد، با تزریق عضلانی ژن GFP به موش به همراه دو پیشبر ویروس سیتومگال (pEGFP-C1) و پیشبر RSV، بیان پروتئین GFP و mRNA مربوطه در محل تزریق به روشنی مشاهده شد (۱۹). در ۲۱ مورد از حیواناتی که یک دوره سه هفته‌ای از دی.ان.ای مورد نظر تغذیه شده بودند، پروتئین GFP یا mRNA در کبد، طحال، خون و یا سلول‌های اپیتلیوم روده قابل تشخیص بود. همچنین در دو پژوهش جداگانه، پس از یک دوره تغذیه سه هفته‌ای هیچ قطعه‌ای از ژن GFP که نمونه‌های دی.ان.ای از بافت‌های طحال، کبد و انتهای دم موش برداشته شده بود مشاهده نشد. در یک آزمایش جداگانه که شامل تغذیه روزانه ۵۰ میلی‌گرم از دی.ان.ای (pEGFP-C) به موش بود، بعد از ۸ نسل هیچ نمونه‌ای از GFP با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در بافت‌های موش قابل تشخیص نبود

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

(۱۹). از این پژوهش‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که در شرایط *in vivo* ژن/پروموتور ساختارهایی هستند که به وضوح قابل تشخیص‌اند. به‌عنوان مثال روش ژن درمانی (مثل تزریق عضلانی) منجر به بیان ژن در سلول‌های سوماتیک می‌شود یا هنگامی که در حیوانات تغذیه به‌صورت دهانی باشد ژن/پروموتور قابل تشخیص خواهد بود.

در مورد سرنوشت دی.ان.ای خورده شده مجموعه‌ای از مقالات توسط شوبرت و همکاران (۱۹۹۲-۲۰۰۱) منتشر شده است. در یک آزمایش (۱۹۹۴) آنها توانستند با خوراندن شکل حلقوی باکتریوفاز M13 (7.2 KB ~) به موش، قطعات دی.ان.ای کوچک را در اندام‌ها و بافت‌های خاص تشخیص دهند. این قطعات معمولاً اندازه‌ای بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز داشتند. هر چند قطعات تا ۱/۷ کیلو باز در مدفوع و تا ۵۰۰ جفت باز در خون هم تشخیص داده شد. این قطعات دی.ان.ای ۲ الی ۷ ساعت بعد از تغذیه قابل تشخیص بود. مجموع همه قطعات دی.ان.ایی که از تمام بافت‌ها و مدفوع موش‌های تغذیه شده بدست آمد، ۲ تا ۴ درصد از مجموع کل دی.ان.ای M13 را شامل می‌شود و تنها ۰/۰۱ درصد در

خون قابل تشخیص بود. بنابراین ۹۶-۹۸ درصد از دی.ان.ای خورده شده احتمال دارد به‌سرعت و به‌طور کامل به قطعات بسیار کوچک و غیر قابل تشخیص تبدیل شوند. علاوه بر این، در شرایط آزمایشگاهی دی.ان.ای باکتریوفاز M13 در خون به‌طور کامل در عرض ۶ ساعت تخریب شد. آن‌ها نتیجه گرفتند که دی.ان.ای یک جز طبیعی در مواد غذایی بوده و در طی هضم به‌طور گسترده‌ای تخریب می‌شود (۳۵).

در پژوهشی بر روی ماهی قزل‌آلای اقیانوس اطلس تغذیه شده با غذای حاوی سویا تراریخته، قطعه ژن گیاهی (به طول ۱۸۰ جفت باز) و قطعات دی.ان.ای تراژن (۱۲۰ جفت باز و ۱۹۵ جفت باز) را در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش و دی.ان.ای رژیم غذایی را در بافت‌های روده‌ای ماهی تشخیص دادند (۳۲ و ۳۱). در پژوهش دیگری، پس از افزودن دی.ان.ای استخراج شده از ذرت و سویا تراریخته به غذای ماهی، دی.ان.ای رژیم غذایی در دستگاه گوارش، کبد، خون و کلیه تشخیص داده‌اند (۳۲). در یک پژوهش دیگر بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه یک رژیم غذایی مخلوط حاوی سویا تراریخته

قطعات دی.ان.ای کلروپلاست (۲۵۷ جفت باز) را در سطوح مختلف محتویات دستگاه گوارش، در لکوسیت‌ها و ماهیچه تشخیص دادند. این یافته تاییدی بر نتایج به دست آمده در مورد امکان پایداری و جذب دی.ان.ای خارجی در پژوهش‌های ماهی آزاد اقیانوس اطلس است. در پژوهش‌های انجام شده بر روی ماهی قزل‌آلا که در آن دی.ان.ای خارجی به صورت داخل وریدی و عضلانی تزریق شده بود، قطعاتی از دی.ان.ای خارجی را در بافت‌های مختلف مانند کبد، کلیه، طحال و عضلات مشاهده کردند (۴۰ و ۳۲).

پژوهش‌های بررسی سرنوشت دی.ان.ای گیاهی در طیور نتایج متغیری را نشان می‌دهد. در یک پژوهش صورت گرفته، قادر به تشخیص دی.ان.ای گیاهی در عضله جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ذرت تراریخته نشدند (۹). در پژوهش‌های انجام شده، قطعات دی.ان.ای گیاهی در دستگاه گوارش قابل تشخیص بود. در حالی که دی.ان.ای نوترکیب تنها در بخش‌هایی از دستگاه گوارش تشخیص داده شده است. "بخش عمده‌ای" از قطعات شناسایی شده در این پژوهش‌ها به طول ۱۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز

است. با این حال قادر به تشخیص قطعه دی.ان.ای تراژن ۱۸۰۰ جفت‌بازی از سنگدان پرندگان تغذیه شده با ذرت Bt شدند. همچنین، قطعات دی.ان.ای با تعداد نسخه بالا نسبت به قطعه ژن تک کپی در اندامک‌ها بسیار بیشتر شناسایی شده است. پژوهش‌های دیگر مبنی بر گزارش تشخیص قطعات دی.ان.ای گیاهی در بافت‌های مختلف از قبیل کبد، طحال، عضلات و خون بوده، در حالی که دی.ان.ای تراریخته، تنها در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش تشخیص داده شده است (۲۰، ۲ و ۲۷). در این پژوهش‌ها قطعات شناسایی شده در بافت‌ها بیشتر به طول ۱۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز بوده است. همچنین، قطعات دی.ان.ای آلل‌های با تعداد نسخه بالا بسیار بیشتر از قطعاتی از ژن تک نسخه شناسایی شده است (۳۰).

در پژوهش‌های انجام شده قطعه دی.ان.ای خاص کلروپلاست با نسخه بالا تا ۷۲ ساعت در محتویات دستگاه گوارش خوک شناسایی شده است. بزرگترین قطعه، مربوط به قطعه خاص کلروپلاست به اندازه ۱۰۲۸ جفت باز، از نمونه‌های خوراک هر دو ذرت تراریخته و غیرتراریخته در معده، دوازدهه و سکوم خوک

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

۳۰۰ تا ۱۳۶۳ جفت باز باشد تفاوت روشنی در ثبات دی.ان.ای آزاد گیاه در محل گوارشی و pH مایع وجود دارد. دی.ان.ای تراریخته آزاد در مایع دئودنوم در pH=۷ پایدار است و در آن تکه‌های کمتر از ۵۲۷ جفت باز تا ۲ دقیقه و قطعات به بزرگی ۱۳۶۳ جفت باز تا نیم دقیقه تشخیص داده شد بود. نتایج بدست آمده از یک آزمایش دیگر که در آن، گوسفند با علوفه و دانه ذرت تغذیه شده بود، نشان داد که یک قطعه ۱۹۱۴ جفت بازهای تراریخته قابل تکثیر در نمونه‌های شکمبه ۵ ساعت بعد از تغذیه با دانه ذرت بود (۱۱ و ۱۶). با این حال، این توالی در خوراک سیلو شده جهت تغذیه گوسفند نمی‌تواند تکثیر شود. به طوری که در ذرت علوفه و دانه ذرت سیلو شده توالی هدف هر دو ژن به ۲۱۱ جفت باز کاهش یافته و پس از ۳ تا ۲۴ ساعت پس از تغذیه در گوسفند مشاهده شد. همچنین پس از تغذیه گوسفند، نه در خوراک سیلو شده و نه دانه ذرت توالی دی.ان.ای هدف گیاه در مدفوع وجود نداشت، که این به دلیل سرعت آهسته عبور مواد گوارشی در دام تشخیص داده شده است (۲).

برخی پژوهش‌ها در مورد پایداری

تشخیص داده شده است. به طور معمول بسیاری از دی.ان.ای نو ترکیب در دستگاه گوارش تخریب شده و تنها تکه‌های کوچک (۱۱۰ جفت باز) را می‌توان در تمام معده، دوازدهه، ائیلوم و سکوم شناسایی شده است (۷، ۸ و ۳۶).

بیشتر بررسی سرنوشت دی.ان.ای خارجی در دستگاه گوارش گوسفند هم در شرایط آزمایشگاهی و همچنین در شرایط طبیعی انجام شده است. نتایج حاصل از آزمایش شرایط آزمایشگاهی نشان داد که هر دو دی.ان.ای پلاسمید و دی.ان.ای کروموزومی در محیط دستگاه گوارش به صورت ناقص تخریب شده بود. توالی هدف دی.ان.ای پلاسمید به اندازه ۳۵۰ جفت باز پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در مایع شکمبه و تا ۲ ساعت پس از انکوباسیون در بزاق تازه گوسفند تکثیر شد. در پژوهش مشابه توالی هدف دی.ان.ای کروموزومی ذرت، تنها پس از ۱ دقیقه در مایع شکمبه و تا ۲۴ ساعت در بزاق تازه گوسفند قابل تکثیر بود. پس از آن، وجود دی.ان.ای آزاد گیاه در مایعات شکمبه، دوازدهه و مدفوع ثابت شد (۲، ۳ و ۳۶).

نتایج نشان داد زمانی که اندازه قطعات بین

دی.ان.ای نوترکیب در ترکیبات مختلف گیاهی که به عنوان خوراک دام استفاده شده بود چه در شرایط آزمایشگاهی و چه در محیط در محتویات شکمبه گاو قابل تشخیص بودند. نتایج مختلف نشان می‌دهد که قطعات دی.ان.ای گیاه (۱۷۹-۵۲۷ جفت باز) از دانه‌های آسیاب شده سبوس دار، نسبت به بذر بیشتر فرآوری شده، می‌تواند برای طولانی‌ترین زمان انکوباسیون (تا ۴۸ ساعت) در مایع شکمبه شناسایی شود. فیپس قطعاتی از دی.ان.ای کلروپلاست و دی.ان.ای تراژن در سراسر نمونه شکمبه و دوازدهم تشخیص داد، در حالی که قطعات دی.ان.ای کلروپلاست تنها در مدفوع گاو قابل تشخیص بودند (۲۸).

اندازه قطعات دی.ان.ای کلروپلاست شناسایی شده در گوارش ۱۱۷۶ جفت باز در شکمبه و در دوازدهم ۳۵۱ جفت باز و اندازه قطعات در نمونه مدفوع کاهش یافته است. در پژوهش انجام شده بر روی گوساله، توالی خاص کلروپلاستی و قطعه دی.ان.ای تراژن (۱۱۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) در شیردان، ژوژنوم و سکوم پس از تغذیه (۵ تا ۱۸ ساعت) تشخیص داده شد (۱۳ و ۲۱).

تا کنون تنها در دو پژوهش سرنوشت ذرت

تراریخته را در دستگاه گوارش حیوانات وحشی، گوزن زرد و دیگری در گراز بررسی کرده‌اند (۴۲). در اولین پژوهش کشف دی.ان.ای گیاهی مثل توالی خاص کلروپلاست (از ۱۷۳ جفت باز تا ۸۹۶ جفت باز) و قطعه ژن خاص ذرت (۳۲۹ جفت باز) و قطعات دی.ان.ای نوترکیب، در اندازه ۲۰۴ تا ۱۴۲۳ جفت باز، در نمونه‌های دستگاه گوارش گوزن زرد شناسایی شده است (۴۲). در گراز وحشی، هر دو قطعه از دی.ان.ای خاص کلروپلاست گیاهی (۱۷۳ جفت باز) و قطعات دی.ان.ای نوترکیب (از ۲۱۱ تا ۷۲۷ جفت باز) در دستگاه گوارش تشخیص داده شده است (۴۲).

در انسان، تنها چند بررسی پایداری دی.ان.ای در دستگاه گوارش انجام شده است. پایداری دی.ان.ای در ترکیب‌های غذایی سویا و ذرت تراریخته از طریق انکوباسیون غذاها و دی.ان.ای در محیط شبیه‌سازی شده روده انسان بررسی شد. نتایج به دست آمده از شبیه‌سازی دستگاه گوارش نشان داد که دی.ان.ای تغذیه شده گیاهی در مقایسه با دی.ان.ای طبیعی (برهنه) با ثبات‌تر است. نتایج نشان داد که تفاوت‌هایی بین این دو ماده غذایی وجود

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

انسان در قسمت بالایی دستگاه گوارش سالم مانده اما به طور کامل در روده بزرگ تخریب می شود و هیچ قطعه ای از تراژن دیگر قابل تشخیص نیست. پژوهش های انجام شده بر روی پایداری دی.ان.ای در دستگاه گوارش نشان دهنده این است که بیشتر دی.ان.ای مصرف شده به شکل پراکنده شده درآمده و قابلیت تشخیص آن کاهش می یابد و به انتخاب اندازه قطعه قابل تکثیر وابسته است. علاوه بر این، نتایج منعکس کننده تفاوت در روند تخریب مواد غذایی فرآوری شده در دستگاه گوارش، از دی.ان.ای بدست آمده در مدل های مختلف حیوانی است. چند پژوهش هم در مورد انتقال دی.ان.ای از مواد غذایی خورده شده به روده انسان انجام شده است. در یک پژوهش که در هر وعده غذایی ۶۰۰ گرم گوشت خرگوش (که دربردارنده ۱۰۱۴ نسخه از ژن H-RERV) مصرف شده بود، قطعات دی.ان.ای داخلی با تعداد نسخه بالا مربوط به خرگوش (در حدود ۲۵۰ جفت باز) مانند دی.ان.ای رتروترانسپوزن (RERV-H) و دی.ان.ای میتوکندری خرگوش در خون محیطی انسان تشخیص داده شد. علاوه بر این ۵ ساعت بعد از غذا، حداکثر ۲۰۰ نسخه از

داشته و سویا نسبت به ذرت به تخریب حساس تر است هم چنین اندازه دی.ان.ای استخراج شده از سویا و ذرت به طور کامل متفاوت است. دی.ان.ای بدست آمده از ذرت وزن مولکولی بالایی داشته درحالی که دی.ان.ای مشتق شده از سویا به صورت گسترده ای تکه تکه شده بود و وزن مولکولی آن در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز بود. که به احتمال زیاد این تفاوت به منبع مواد مربوط می شود. چرا که سویا یک محصول فرآوری شده محتوی قطعات کوچکی از مواد بوده، درحالی که دانه ذرت به طور مستقیم و بدون فرآوری استفاده شده بود (۲۵، ۳۸). بقای سویا در دستگاه گوارش انسان و ائیلیستومها^۲ بررسی شده است، غذا خورده شده در ائیلیستومها شامل 3 x 10¹² نسخه از ژن بوده و حداکثر ۳/۷ درصد از مواد گوارشی در استوما قابل بازیابی تشخیص بود. تعیین بقای قطعات ژن در مدفوع، آزمایش دیگری بود که در افراد با دستگاه گوارش سالم انجام شد. در این بررسی، ژن مورد نظر قابل تشخیص نبود (۲۲). نتایج نشان داد که بخش کوچکی از تراژن ها در سویا، طی عبور از دستگاه گوارش

2- ileostomists

H-RERV در هر میلی لیتر خون شناسایی شد، که مربوط به حدود ۱۰۶ مولکول H-RERV موجود در گردش خون است (۶).

انتقال پروتئین نو ترکیب به بافت‌های حیوانی

مشخص شده حداقل واحد عملکردی ژن *cryIAb* ۱۸۰۰ جفت باز بوده و تکثیر دی.ان.ای به این اندازه حتی قبل از فرآوری خوراک دام دشوار است (۲، ۲۷، ۱۸، ۱۴) و بازیابی یک قطعه ۵۱۹ جفت باز ژن *cryIAb* از خون و بافت بچه خوک گزارش شده است در این پژوهش نشان دادند که بالاترین میزان بازیابی (۳۰ درصد) از خون حیوانات بچه خوک تغذیه شده با ۵۰ درصد ذرت MON810 به مدت ۳۵ روز است. برای سایر بافت‌ها (طحال، کبد و کلیه)، میزان تشخیص حدود ۱۰ درصد بود و کمترین مربوط به عضلات ران (۵ درصد) است (۲۷).

نشان داده شده است که پروتئین *CryIAb* در دستگاه گوارش گاو در مقادیر مختلف از ۱/۴ به ۱/۵ نانوگرم باقی می ماند. وسترن بلات نشان داد که پروتئین ۶۲ کیلو دالتونی موجود در ذرت به تکه‌های ۱۷ و ۳۴ کیلودالتونی

شکسته می شود (۲۸). در داخل دستگاه گوارش خوک، پروتئین از تمام بخش‌های گوارشی، بدون هیچ عوارض جانبی گزارش شده است. پروتئین *CryIAb* در خون و یا اندام (۲۸) گاو تغذیه شده با ذرت BT تشخیص داده نشده است. نتایج نشان می دهد پروتئین‌های *Cry* بسیار اختصاصی عمل کرده و تنها بعضی از گونه‌های حشرات آفت را از بین می برد و هر کدام از پروتئین‌های خانواده *Cry* تنها چند گونه از حشرات را تحت اثر قرار می دهد (۲، ۴ و ۱۵). ملاحظه شده است که پروتئین *Cry* هیچگونه اثر سمی برای پستانداران از جمله انسان ندارد. این امر احتمال دارد به دلیل عدم وجود جایگاه‌های اتصال پروتئین *Cry* در پستانداران باشد. نتایج حاصل از پژوهش‌ها بر روی اثرهای سمی پروتئین‌های خانواده *Cry* نشان دهنده عدم وجود اثرهای معنی دار بروی افزایش وزن بدن و مشاهدات بالینی است (۲۱). بررسی اثر پروتئین *CryIAb* بر روی سلول‌های پستانداران تفاوت معنی داری را بر شکل سلول‌های کبدی گاو و هم چنین ترشح آلبومین نشان نداد (۲۸). بررسی میزان سمیت پروتئین *CryIAb* بر روی موش نیز تفاوت

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

انتقال پیدا نکرده است.

بحث و نتیجه گیری

با شروع عرضه گیاهان تراریخته بحث‌های عمومی مربوط به طرز تولید، ایمنی و استفاده از مواد غذایی تولیدی از این روش برای انسان و یا حیوانات مزرعه بوجود آمده است. ملاحظه‌های اصلی در خصوص امکان انتقال دی.ان.ای منتقل شده به محصولات تراریخته به سلول‌های پستانداران و یا به باکتری‌های دستگاه گوارش در حیواناتی که از این محصولات تغذیه شده‌اند و امکان انتقال ژن مربوطه مطرح شده است. جذب دی.ان.ای خارجی در سیستم پستانداران به شرایطی مانند بقای دی.ان.ای در غذا و در دستگاه گوارش مرتبط است. ویژگی‌های دستگاه گوارش بین گونه‌های مختلف بسیار متفاوت است و این بدان معنی است که نتایج تداوم و تخریب تراژن از پژوهش‌های مربوط به گونه مختلف حیوانات را تحت اثر قرار داده و ممکن است به‌طور مستقیم قابل مقایسه با انسان نباشد. این نشان می‌دهد که عوامل مختلفی در بررسی سرنوشت تراژن و نتایج بدست آمده دخیل بوده و طیف وسیعی از عوامل تعیین کننده که

معنی داری نشان نداد. همچنین در پژوهشی موش‌ها سیب‌زمینی دارای Cry3A (زیر گروه خانواده Cry) را به صورت خوراکی مصرف کردند و هیچ‌گونه نشانه مسمومیت در آنها مشاهده نشد (۱۳). در پژوهش‌های حیوانی تفاوت معنی داری در سلامت عمومی و میزان رشد در خوک‌های تغذیه شده با ذرت Bt مشاهده نشد (۳۶ و ۷). بررسی اثر برنج تراریخته حاوی Cry1Ab بر رشد، زنده‌مانی و سلامت جوجه‌های گوشتی هیچ‌گونه تفاوت معنی داری را نشان نداد (۱). هر چند گزارشی مبنی بر تغییرات میکروسکوپی در روده موش‌های تغذیه شده با جیره سیب زمینی Cry1 گزارش شده است (۳۱).

از منابع بررسی شده، واضح است که قطعه ژن *cry1Ab* در حال حاضر با فرکانس متغیر در خون، گوارش و بافت‌های حیوانات مزرعه تشخیص داده شده است. همزمان، دی.ان.ای گیاهی خاص از نمونه‌های مربوطه نیز تشخیص داده شده است که نشان می‌دهد دی.ان.ای تراژن با دی.ان.ای گیاهی خاص متفاوت نیست. علاوه بر این، پروتئین Cry1Ab در روده گوارشی تشخیص داده شده اما در بیشتر موارد به خون و یا اندام‌های

میزان قطعه قطعه شدن دی.ان.ا، روش تخریب دی.ان.ا، نوع نمونه، حضور بازدارنده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و حد تشخیص قطعه هدف تحت اثر قرار می‌گیرد. باید سعی شود یک دید کلی از چگونگی توزیع و اندازه قطعه دی.ان.ای موجود در منابع غذایی مختلف و محفظه دستگاه گوارش که در پستانداران گوناگون متفاوت است و طرز قرارگیری داخل سلولی و فعل و انفعالات پروتئین و اثر آن‌ها بر ثبات و تخریب دی.ان.ا و هم‌چنین چگونگی غلبه بر مولکول‌های مانع دیواره روده و راه‌های ممکن برای انتقال مولکول‌های بزرگ از لومن روده به خون و بافت جهت بررسی سرنوشت مولکول‌های دی.ان.ا که وارد دستگاه گوارش می‌شوند به دست آورده شود تا مکانیزم‌های جذب و عمل بهتر شناخته شوند. هم‌چنین از منابع بررسی شده واضح است که قطعه تراژن در حال حاضر با مقادیر متغیر در خون، گوارش و بافت‌های حیوانات مزرعه تشخیص داده شده است. هم‌زمان، دی.ان.ای گیاهی خاص از نمونه‌های مربوطه نیز تشخیص داده شده است، که نشان می‌دهد دی.ان.ای تراژن با دی.ان.ای گیاهی خاص متفاوت نیست. علاوه

شامل اهداف مشخص، طراحی پژوهش، میزان سطح انتخاب، حساسیت، پروتکل یا روش، تجزیه و تحلیل داده‌ها و تفسیر مبتنی بر علم نتایج بستگی دارد.

نتایج به دست آمده از پژوهش‌های انجام شده در جوندگان، ماهی، مرغ، خوک، گوسفند، گاو، حیوانات وحشی و انسان نشان می‌دهد که دی.ان.ای مشتق شده از خوراک هم‌چنان به میزان متفاوت و به شکل تکه تکه شده در دستگاه گوارش یافت شده و دستگاه گوارش مانع مطلق در برابر جذب مولکول‌های خارجی پس از خوردن غذا نیست. علاوه بر این، نتایج منعکس کننده تفاوت در روند تخریب مواد غذایی فرآوری شده در دستگاه گوارش، از دی.ان.ای بدست آمده در مدل‌های مختلف حیوانی است. مقدار کمی از دی.ان.ا به دلیل این که در مجموعه دی.ان.ا-پروتئین محافظت شده می‌تواند در سیستم‌های میزبان از طریق سلول‌های اپیتلیوم روده در چندین اندام و گردش خون و یا غدد لنفاوی تشخیص داده شوند. به‌طور کلی، تشخیص دی.ان.ای خورده شده توسط تعدادی از عوامل، از جمله تعداد نسخه ژن، پردازش غذا، پایداری دی.ان.ا در دستگاه گوارش،

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

شده بر روی دی.ان.ای در دستگاه گوارش نشان دهنده این است که بیشتر دی.ان.ای خوراک مصرف شده به شکل پراکنده در آمده و قابلیت تشخیص آن کاهش یافته و به انتخاب اندازه قطعه قابل تکثیر وابسته است. علاوه بر این، نتایج منعکس کننده تفاوت در روند تخریب مواد غذایی فرآوری شده در دستگاه گوارش، از دی.ان.ای بدست آمده در مدل‌های مختلف حیوانی است. همه دی.ان.ای، از جمله دی.ان.ای موجود در موجودات تراریخته، از همان چهار نوکلئوتید یکسان تشکیل شده است به این معنی که استفاده از روش‌های نو ترکیب در تولید غذا تغییرات عمده‌ای را در خصوصیات شیمیایی دی.ان.ای ایجاد نمی‌کند. نظر به این‌که دی.ان.ای تراژن در ساختار متفاوت از دی.ان.ای معمول موجود در سلول‌های حیوان و یا گیاه نیست، تنها تفاوت در ترتیب توالی‌های رونویسی است، پس هیچ دلیلی برای شک کردن به اساس عملکرد دی.ان.ای تراژن با دی.ان.ای گیاهی غیرتراریخته برای مصرف وجود ندارد.

بر این، پروتئین نو ترکیب هم در روده گوارشی، خون و یا اندام‌ها بدون عوارض جانبی تشخیص داده شده است. تفاوت در تشخیص دی.ان.ای ممکن است با توجه به ترکیبات گیاهی مختلف که به عنوان غذا استفاده می‌شود، مربوط به تفاوت گونه‌ها، سیستم گوارشی متفاوت، تفاوت در مرحله رشد (نوجوان در مقابل بزرگسالان)، تفاوت در چگونگی آزمایش انجام شده و همچنین تغییر در حساسیت روش‌ها و محدودیت‌های تشخیص است. از طرف دیگر به نظر می‌رسد وجود سیستم‌ها و سدهای دفاعی متفاوت در بدن موجوداتی مثل انسان در پاسخ ایمنی نقش دارند و عوامل متعددی موجب عدم تغییر در توالی ژنومی می‌شوند. نتایج به دست آمده از پژوهش‌های انجام شده در جوندگان، ماهی، مرغ، خوک، گوسفند، گاو، حیوانات وحشی و انسان نشان می‌دهد که دی.ان.ای مشتق شده از خوراک هم‌چنان به میزان متفاوت و به شکل تکه تکه شده در دستگاه گوارش یافت شده و دستگاه گوارش مانع مطلق در برابر جذب مولکول‌های خارجی پس از خوردن غذا نیست. پژوهش‌های انجام

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

References

منابع مورد استفاده

۱. افراز ف.، قره‌یاضی ب.، خوش خلق‌سیما ن.، لطف‌الهیان ه.، حسینی س.ع.، نعمتی س.ا.، زمستان (۱۳۸۷). مجله ایمنی زیستی، جلد اول، شماره دوم.
۲. رهنما ح.، معالی‌امیری ر.، صالحی‌جوزانی غ.، (۱۳۹۰). مهندسی ژنتیک گیاهی و نشانگرهای انتخابی. انتشارات پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.
3. Alexander TW. Sharma R. Deng MY. Whetsell AJ. Jennings JC. Wang Y. Okine E. Damgaard D. and McAllister TA. (2004). Use of quantitative real-time and conventional PCR to assess the stability of the *cp4 epsp* transgene from Roundup Ready canola in the intestinal, ruminal, and fecal contents of sheep. *J. Biotechnol* 112:255-266.
4. Betz FS. Hammond BG. and Fuchs RL. (2000). Safety and advantages of *bacillus thuringiensis*- protected plants to control insect pests. *Regulatory toxicology and pharmacology* 32:156-173.
5. CAST (2006). Safety of Meat, Milk, and Eggs from animals fed crops derived from Modern biotechnology. *Animal agriculture's future through Biotechnology*, Issue Paper 34.
6. Forsman A. Ushameckis D. Bindra A. Yun Z. Blomberg J. (2003). Uptake of amplifiable fragments of retrotransposon DNA from the human alimentary tract. *Mol Genet Genomics* 270: 362-368.
7. Chowdhury EH. Kuribara H. Hino A. Sultana P. Mikami O. Shimada N. Guruge KS. Saito M. and Nakajima Y. (2003). Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *Journal of Animal Science* 81:2546–2551.
8. Chowdhury EH. Mikami O. Murata H. Sultana P. Shimada N. Yoshioka M. Guruge KS. Yamamoto S. Miyazaki S. Yamanaka N. Nakajima Y. (2004). Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11. *J Food Prot* 67: 365-370.
9. Deaville ER and Maddison BC. (2005). Detection of transgenic and endogenous plant DNA fragments in the blood, tissues, and digesta of broilers. *J Agric Food Chem* 53: 10268-10275.

10. Duggan PS. Chambers PA. Heritage J. and Forbes JM. (2000). Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. FEMS Microbiology Letters, 191:71-77.
11. Duggan PS. Chambers PA. Heritage J. and Michael Forbes J. (2003). Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep. Br J Nutr 89: 159-166.
12. EFSA (2009). Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinions on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. The EFSA Journal. 1108:1034-1035.
13. EFSA (2007). Statement on the fate of recombinant DNA or proteins in meat, milk and eggs from animals fed with GM feed. Retrieved July 19, 2007, from http://efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale.
14. EPA (1995). EPA Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* Cry1A(b) Delta Endotoxin and Its Controlling Sequences in Corn, March 21, 1995 (Ciba Seeds).
15. Flachowsky G. Aulrich K. Bohme H. and Halle I. (2007). Studies on feeds from genetically modified plants (GMP) - Contributions to nutritional and safety assessment. Animal Feed Science And Technology, 133, 2-30.
16. Forbes JM. Blair GE. Chiter A. and Perks S. (2000). Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation. U.K. MAFF Report, CS0116.
17. Gallorini E. Allori EM. Bazzicalupo L. Canto R. Fani P. Aninipieri P. Vettori C. and STOTOZKY G. (1994). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. FEMS Microbiol. Ecol. 15:119-126.
18. Guertler P. Paul V. Albrecht C. Meyer HHD. (2009). Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and *CryIAb* protein from feed into bovine milk. Anal Bioanal Chem 393:1629-1638.
19. Hohlweg U. and Doerfler W. (2001). On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. Mol. Genet. Genomics 265:225-233.
20. Jennings JC. Albee LD. Kolwyck DC. Surber JB. Taylor ML. Hartnell GF. Lirette RP. and Glenn KC. (2003). Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn Borer corn. Poultr. Sci 82:371-380.

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"

21. Mazza R, Soave M, Morlacchini M, Piva G and Marocco A (2005) Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Research* 14, 775–784.
22. Martı̂n-Oâue SM. O'Donnell AG. Arin̄o J. Netherwood T. Gilbert HJ. and Mathers JC. (2002). Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulations. *Br. J. Nutr.* 87:533-542.
23. McClintock JT. schaffer CR. and Sjoblad RD. (1995). A comparative review of mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science* 45: 95-105.
24. Nemeth A. Wurz A. Artim L. Charlton S. Dana G. Glenn K. Hunst P. Jennings J. Shilito R. and Song P. (2004). Sensitive PCR analysis of animal tissue samples for fragments of endogenous and transgenic plant DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6129–6135.
25. Netherwood T. Martı̂n-Or'ue SM. O'Donnell AG. Gockling S. Graham J. Mather JC. and Gilbert HJ. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat. iotechnol* 22:204-209.
26. Nielsen KM. Johnsen PJ. Bensasson D. and Daffonchio D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res* 6:37-53.
27. Nielsen KM. and Townsend JP. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat Biotechnol.* 22: 1110-1104.
28. Phipps RH. Deaville ER. and Maddison BC. (2003). Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood, and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci* 86:4070-4078.
29. Palka-Santini M. Schwarz-Herzke B. Hösel M. Renz D. Auerochs S. Brondke H and Doerfler W. (2003). The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 270:210-215.
30. Rossi F. Morlacchini M. Fusconi G. Pietri A. Mazza R. and Piva G. (2005). Effect of Bt corn on broiler growth performance and fate of feed-derived DNA in the digestive tract. *Poult Sci* 84:1022-1030.
31. Sanden M. Bruce IJ. Rahman MA. And Hemre GI. (2004). The fate of transgenic sequences present in genetically modified plant products in fish feed, investigating the survival of GM soybean DNA fragments during feeding trials in Atlantic salmon, *Salmosalar L.* *Aquaculture* 237:391-405.

32. Sanden M. Berntssen MHG. And Hemre GI. (2007). Intracellular localization of dietary and naked DNA in intestinal tissue of Atlantic salmon, *Salmo salar* L, using in situ hybridization. *Eur Food Res Technol* 225:533-543.
33. Sexena D. and Stotzky G. (2001). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 33:1225-1230.
34. Schubbert R. Hohlweg U. Renz D. and Doerfler W. (1998). On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol. Gen. Genet* 259:569-576.
35. Schubbert R. Lettmann C. and Doerfler W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet* 242:495-504.
36. Sharma R. Damgaard D. Alexander TW. Dugan MER. Aslhus JL. Stanford K. and Mcallister TA. (2006). Detection of transgenic and endogenous plant DNA in Digesta and Tissues of sheep and pigs fed Roundup ready canola meal. *J. Agric. Food Chemistry* 54:1699-1709.
37. Shimada N. Kim YS. Miyamoto KYH. Shioka M. and Murata H. (2003). Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. *Journal of veterinary Science* 65(2):187-191.
38. Stevens CE. and Hume ID. (1998). Contributions of Microbes in vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients *Physiol Rev* 78:393-427.
39. Thomson JA (2001) Horizontal transfer of DNA from GM crops to bacteria and mammalian cells. *J Food Sci* 66: 188-193.
40. Tonheim TC. Bøggwald J. and Dalmo RA. (2008). What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol* 25: 1-18. <http://ucbiotech.org>.
41. Traavik T. Nielsen KM. and Quist D. (2007). Genetic engineering of living cells and organisms. In: Traavik T, Lim LC eds., *Biosafety First: Holistic approaches to risk and uncertainty in genetic engineering and genetically modified organisms*, Tapir Academic Press, Trondheim, 2007.
42. Wiedemann S. Lutz B. Albrecht C. Kuhen R. Killermann B. Einspanier R. and Meyer H. (2009). Fate genetically modified maize and conventional rape seed, and endozoochory in wild boar (*Sus scrofa*). *Mamm. Biol.* 74: 191-197.

"ستارزاده و همکاران، سرنوشت دی.ان.ای و پروتئین نو ترکیب (تراژن) در دستگاه گوارش پستانداران"