مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

فرآورده‌های تراریخته و روش‌های نوین شناسایی آن‌ها

معصومه اطهری‌نیا

عضو هیات علمی پژوهشگاه استاندارد، پژوهشکده غذایی و فرآورده‌های کشاورزی، گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی

atharinia_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۱۷

صفحه ۹۴-۷۷

چکیده

به دلیل افزایش جمعیت در سال‌های آتی، تامین غذای کافی بزرگترین مشکل جهانی محسوب می‌شود و به نظر می‌رسد یکی از راه‌های برآورده کردن این نیاز تولید فرآورده‌های تراریخته است. فرآورده‌های تراریخته فرآورده‌هایی هستند که با استفاده از زیست‌فناوری مدرن جهت ایجاد یا افزایش یک صفت مطلوب نظیر افزایش مقاومت نسبت به علف‌کش‌ها یا بهبود خصوصیات تغذیه‌ای ایجاد می‌شوند. از مزایای فرآورده‌های تراریخته می‌توان به ایجاد مقاومت آن‌ها در برابر آفات، بیماری‌ها و تنش‌های غیرزیستی اشاره کرد. با توجه به اینکه ایران یکی از کشورهای عضو پروتکل بین‌المللی ایمنی زیستی (کارتاهنا) است و مراجع ذی‌صلاح قانونی، متولی تشخیص اقلام تراریخته و ارزیابی ایمنی آن‌ها هستند، از اینرو شناسایی و بررسی ایمنی این فرآورده‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. در این مقاله سعی شده است روش‌های نوین شناسایی و ردیابی فرآورده‌های تراریخته مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تراریخته، GMO، مهندسی ژنتیک، روش‌های شناسایی.

مقدمه

به دلیل افزایش جمعیت، تامین غذای کافی بزرگترین مشکل جهانی محسوب می‌شود و به‌نظر می‌رسد یکی از راه‌های برآورده کردن این نیاز تولید فرآورده‌های تراریخته باشد. فرآورده‌های تراریخته فرآورده‌هایی هستند که با استفاده از زیست‌فناوری مدرن جهت ایجاد یا افزایش یک صفت مطلوب نظیر افزایش مقاومت نسبت به علف‌کش‌ها یا بهبود خصوصیات تغذیه‌ای ایجاد می‌شوند. از مزایای فرآورده‌های تراریخته می‌توان به ایجاد مقاومت آن‌ها در برابر آفات، بیماری‌ها و تنش‌های غیر زیستی اشاره کرد. گیاهان تراریخته می‌توانند خطر باقیمانده سموم در مواد غذائی را تا حد زیادی کاهش دهند. در حال حاضر طیف وسیعی از فرآورده‌های تراریخته تولید شده‌اند که مجوز ورود برخی از آن‌ها به بازار مصرف صادر شده است و در این میان مسئله‌ای که مطرح است تفکیک فرآورده‌های تراریخته از فرآورده‌های معمولی است (۱، ۴). گرچه تراریخته بودن نمی‌تواند دلیلی برای عدم ایمنی محصول و عدم مصرف آن‌ها باشد، ولی شناسایی این ارقام در بین فرآورده‌های وارداتی از لحاظ موارد زیر دارای اهمیت است:

الف- شناسایی نوع ژن وارد شده یا به دست آوردن اطلاعات مربوط از تولیدکننده آن و ارزیابی ایمنی آن‌ها؛

ب- ایجاد اختلال در تنوع ژنتیکی گونه‌های ایرانی، در صورت تراریخته بودن فرآورده‌های وارداتی؛

پ- درخواست جبران خسارت از کشور واردکننده در صورت وجود اقلام تراریخته به‌دلیل تعهد به پروتکل‌های بین‌المللی (۲).

تراریخته یا ترنس‌ژنیک

ارگانیسم‌های تراریخته یا تغییر ژنتیکی یافته (GMO) ارگانیسم‌هایی هستند که ماده ژنتیکی آن‌ها با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک (تولید دی.ان.ای نوترکیب در شرایط آزمایشگاهی و تزریق آن به داخل سلول) تغییر یافته و صفاتی در آن‌ها به‌وجود آمده که در شرایط طبیعی در آن‌ها وجود ندارد. این ارگانیسم‌ها

می‌توانند میکروارگانیسم، گیاه و یا حیوان باشند. روش‌های مهندسی ژنتیک در حقیقت همان روش‌های به‌نژادی است که با تلاقی گونه‌های مختلف گیاه، حیوان یا میکروارگانیسم، گونه‌ای با صفات جدید پدید می‌آید، با این تفاوت که مهندسی ژنتیک این امکان را در اختیار محققین قرار داده که ژنی را که در شرایط طبیعی وجود ندارد، تولید کنند و نیز صفاتی را از رده‌های دور به یکدیگر منتقل کنند و مزیت آن نسبت به روش‌های به‌نژادی سنتی این است که سریعتر به نتیجه رسیده و می‌توان امکان ورود ژن به قسمت‌های مختلف دی.ان.ا و جهش‌های احتمالی را تا حدودی کنترل کرد (۵).

تاریخچه

فرآورده‌های تراریخته اولین بار در سال ۱۹۹۶ وارد بازار شدند. سطح زیرکشت این فرآورده‌ها درسال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۱ حدود ۳۰ برابر شده است. قابلیت ردیابی فرآورده‌های تراریخته در زنجیره مواد غذایی ابزار بسیار مهمی جهت کنترل ورود و حصول اطمینان از برچسب‌گذاری این فرآورده‌ها است (۳).

یازده سال پس از تولید اولین فرآورده‌های تراریخته، در اواخر سال ۲۰۰۷ میلادی، سطح زیر کشت گیاهان تراریخته به ۳/۱۱۴ میلیون هکتار رسید. امروزه بیش از ۲۳ کشور جهان به کشت و کار گیاهان تراریخته اشتغال دارند و تقریباً بیشتر کشورها جزو مصرف‌کنندگان عمده این قبیل فرآورده‌ها هستند (۶). با وجود اینکه بیش از پانزده سال از مصرف تجاری و غذایی این گیاهان در جهان می‌گذرد، هنوز ملاحظه‌هایی در مورد ایمنی غذاهای ناشی از مهندسی ژنتیک وجود دارد (۷). افزایش ملاحظه مصرف‌کنندگان درباره مواد غذایی تراریخته منجر به اقدام برخی کشورها در ایجاد قوانینی در مورد برچسب‌گذاری این فرآورده‌ها و تدوین پروتکل‌های بین‌المللی شده است، که ایران نیز متعهد به آنهاست. از حدود بیست سال پیش، به دنبال تولید و ورود اولین فرآورده‌های تراریخته به بازارهای جهانی، تحقیق بر روی روش‌های معتبر و قابل اجرا برای ردیابی و شناسایی این فرآورده‌ها و همچنین اثر آن‌ها بر سلامت مصرف‌کنندگان نیز آغاز شد.

پژوهش‌های انجام شده

بحث ایمنی و بی‌خطر بودن مصرف گیاهان تراریخته برای انسان از مواردی است که بسیار مورد توجه است. در حال حاضر دستاوردهای علمی بسیار با ارزشی در سطح کشور در خصوص دستیابی گیاهان تراریخته از قبیل برنج، پنبه، سیب‌زمینی، خرما و کلزای مقاوم به آفات به دست آمده است. بسیاری از دانشمندان معتقدند که تغییر ژنتیکی و تولید فرآورده‌های تراریخته اگرچه در بسیاری زمینه‌ها می‌تواند مفید باشد اما هنوز دارای نکات نامشخص و غیرقابل پیش‌بینی است (۸). سازمان کشاورزی و غذا (FAO) تخمین زده است که تولید غذا در ۲۵ سال آینده باید ٪۶۰ افزایش یابد تا با تقاضا هماهنگ باشد (۹). Uzogara امکان ایجاد حساسیت توسط پروتئین تولید شده از موجودات تغییر ژنتیکی یافته را در افراد مستعد بیان کرده است (۶). Nordlee و همکاران به تهیه بذر با هدف افزایش محتوای پروتئینی خوراک دام تولیدی پرداختند و اقدام به انتقال ژن‌های نوعی آجیل برزیلی به لوبیای سویا کردند که این اصلاح ژنتیکی سبب بروز واکنش‌های حساسیتی در افراد حساس به آجیل برزیلی شده و در نهایت منجر به جمع آوری و حذف محصول از بازار شد (۱۰). Yun و همکاران در سال ۲۰۰۹ میلادی سمیت زایی ذرت تراریخته غنی شده با لیزین را مورد بررسی قرار دادند و در نتایج تحقیقات هیچگونه اثرات جانبی وابسته به دوز مصرفی در موش‌های تغذیه شده با ذرت تراریخته Y642 غنی از لیزین نسبت به ذرت معمولی مشاهده نشد (۱۱). Konig و همکاران در سال ۲۰۰۴ میلادی حساسیت زایی، سمیت‌زایی و به‌طور کلی ارزیابی ایمنی فرآورده‌های تراریخته را به روش مقایسه‌ای مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه به بررسی خصوصیات ژنتیکی و ایجاد پروتئین‌های نوترکیب در فرآورده‌های تراریخته و هم ارزی و مقایسه با همتای آن فرآورده‌ها پرداخته شده است و بر اساس مشاهدات به‌دست آمده امکان ایمنی فرآورده‌های تراریخته وجود دارد (۱۲). Vijayakumar و همکاران به شناسایی فرآورده‌های

ترایختـه‌ای پرداختنـد کـه تحـت فرآینـد حرارتی قرار گرفته بود نتایج ایـن تحقیـق نشـان داده اسـت کـه انـدازه قطعـه PCR عامـل اصـلی در شناسـایی محصـول تراریختـه در مـواد غـذایی فـرآوری شـده اسـت (۱۳). تحققـات Denis و همکـاران نشان داده است که با معرفی فرآورده‌هـای تراریخته و بهـره‌وری و افـزایش رانـدمان کشـاورزی ایـن فـرآورده‌هـا، ٪۸۰ سـطح کشت فرآورده‌های تراریخته در سه کشور آرژانتین، برزیل و ایـالات متحـده امریکـا بوده است (۱۴).

ردیابی و شناسایی ارگانیسم‌های تراریخته

برای تشخیص و ردیابی ارگانیسـم‌های تراریخته روش‌های متعددی شامل ردیابی ژن تغییریافته، پروتئین‌هـای جدیـد و نیـز سایر متابولیت‌های تغییریافته وجـود دارد، که از این میان به علت کـارایی و قابلیـت اعتمـاد، روش‌هـای مبتنـی بـر ژنتیـک بیشـترین کـاربرد را دارد (۱۵). استانداردهای روش‌های ردیـابی و تعیـین میـزان ارگانیسـم‌های تراریختـه توسـط سـازمان بـین المللـی اسـتاندارد جهـانی (ISO) تـدوین شـده اسـت و بسـیاری از آن‌ها با تغییرات جزئی به اسـتاندارد ملـی ایران تبدیل شده‌اند. در استانداردهای ملی ایـران ۹۶۱۳، ۹۶۱۷، ۱۰۷۶۳، ۱۱۷۸۶ روش‌های ردیابی کیفی و کمّی، اسـتخراج اسید نوکلئیک و اصول کلی بـرای اجـرای این روش‌ها، شـامل شـرایط آزمایشـگاه و نحوه گزارش‌دهی شـرح داده شـده اسـت. در روش تشـخیص بـر اسـاس دی.ان.ا بـا اسـتخراج و تکثیـر دی.ان.ای نمونـه بـه روش واکنش زنجیره‌ای پلیمـراز مـی‌تـوان ژن مربـوط بـه فرآورده‌هـای تراریختـه را شناسایی کـرد. بـرای شناسـایی و ردیـابی آن‌ها از آغازگرهای CaMV 35s، NOS و npt II که در ٪ ۹۰ فرآورده‌های تراریختـه وجـود دارد اسـتفاده مـی‌شـود (۴، ۱۶،۱۷،۱۸).

بـرای ایجـاد اثربخشـی GMO فـاکتور اصـلی در اجـرای ایـن قواعـد و اسـتراتژی‌هـای مختلفـی کـه بـه صـورت مستقیم (روش‌های مبتنی بر پـروتئین) یـا غیرمستقیم (روش‌های مبتنـی بـر دی.ان.ا) طبقه‌بندی شد، توسعه پیدا کـرد تـا نقـش GMOها را در زنجیره غذایی بـا اسـتفاده

از فناوری‌های گوناگون آشکار سازد. در روش مبتنی بر پروتئین با روش‌های متفاوت وابسته به تکنیک ELISA پروتئین مورد نظر با استفاده از تراژن‌ها شکسته می‌شود. سیستم ایمونواسی ناقل هم طراحی شده است. به‌عنوان مثال برای شناسایی GMO از روش ایمونو-PCR استفاده می‌شود (۱۹).

در حال حاضر، فناوری رایج PCR به‌طور معمول شامل PCR معمولی و Real Time PCR است. PCR معمولی به دلیل ضعیف بودن الکتروفورز ژل آگارز برای تشخیص قطعات بسیار کوتاه دی.ان.ا مناسب نیست.

از این رو متداول‌ترین روش تجزیه و تحلیل مبتنی بر دی.ان.ا ، Real Time PCR است که به‌طور معمول به دو دسته اصلی طبقه‌بندی می‌شود: در یک نوع از رنگ‌های اتصال‌دهنده دی.ان.ا ، مانند رنگ SYBR green استفاده می‌شود. در نوع دیگر از الیگونوکلئوتیدهای دارای نشانگر فلوروفور بر اساس اصل انتقال انرژی رزونانس فلورسانس (FRET)، مانند کاوشگرهای TaqMan، (کاوشگرهای هیبریداسیون دوگانه) استفاده می‌شود. در گروه اخیر، رنگ‌های اتصال‌دهنده دی.ان.ا و کاوشگر TaqMan بیشترین کاربرد را در روش‌های Real Time PCR دارند (۲۰).

Real Time (qPCR, quantitative PCR) PCR

Real Time PCR از متداول ترین روش‌ها است و بیشترین کاربرد را دارد و امکان جستجو و شناسایی، تشخیص و تعیین کیفیت GMO از طریق TaqMan یا SYBER green را می‌دهد. این تکنولوژی برای ماتریکس‌های غذایی و خوراک دام در هر دو حالت فرآوری شده و نشده مناسب است. محصول نهایی این روش فقط محدود به یک نشانگر است و با افزایش تعداد ارگانیسم‌های تراریخته هر نشانگر باید به طور جداگانه گسترش پیدا کند و این امر سبب دشواری انجام آزمایشات و پیچیدگی نتایج آزمایشگاهی می‌شود. علاوه بر آن دریافت سیگنال‌های منفی فقط عدم وجود GMO شناخته شده را در یک نمونه غذایی تعیین می‌کند.

درواقع دریافت سیگنال‌های مثبت و منفی که هیچ شباهتی به سیگنال‌های GMO شناخته‌شده نداشته باشند، فقط حضور یک GMO ناشناخته در یک نمونه غذایی را به ما نشان می‌دهد نه ماهیت آن را. ماهیت ارگانیسم‌های تراریخته توسط تراژن‌ها شناخته می‌شود. سیگنال‌های qPCR که برخلاف یافته‌های نظری به ثبت برسد، مقدار کمی از ارگانیسم تراریخته را در نمونه آزمایشگاهی نشان می‌دهد (۲۱، ۲۲). هنگام طراحی آزمایش ها برایqPCR، کلیه پروتکل‌ها مانند جابه‌جایی نمونه، برداشت، استخراج نوکلئیک اسید، رونویسی معکوس و qPCR باید به تفصیل شرح داده شده و مورد آزمایش قرار بگیرند (۲۳).

فناوری روش چندگانه qPCR (Multiplex qPCR Strategy)

در روش چندگانه qPCR چند دی.ان.ای هدف در یک آزمایش می‌توانند مورد بررسی قرار بگیرند. این روش سبب می‌شود تعداد اقداماتی که برای شناسایی حضور GMO در یک نمونه صورت می‌گیرد، کاهش یابد. برای ساخت سیستمی با پوشش بالای GMO، بیست و سه PCR سه‌تایی و یک PCR دوتایی برای شناسایی ۴۷ نمونه هدف در ۳۸۴ صفحه کنار هم قرار می‌گیرند. هرچند که محصول این روش به علت امکان وجود نشر رنگ و جذب اسپکتروم‌های فلورسنس دارای محدودیت است. این محدودیت سبب جلوگیری از روی هم افتادن سیگنال‌های متفاوت می‌شود. بخش عمده‌ای از گزارش‌های آزمایش چندگانه qPCR، فقط دو یا سه نمونه هدف رو شناسایی کردند. امروزه بیشترین میزانی که برای ترکیب کشف ارگانیسم تراریخته در یک آزمایش به کار می‌رود تا ۶ نمونه هدف است (۲۲).

فناوری ژل الکتروفورز (CGE Capillary Gel Electrophoresis)

در مقایسه با تکنولوژی ژل الکتروفورزی قدرت وضوح سیستم CGE برای کشف محصولات PCR از آزمایشات چندگانه به مراتب بیشتر است. هرچند که دقت سیستم CGE از تکنولوژی qPCR

کمتر است. حساسیت سیستم CGE نسبت به فناوری qPCR ضعیف‌تر است. روش CGE تفکیک‌پذیری بالایی دارد و برای جداسازی محصول بدون تجهیزات گران قیمت به کمتر از ۱۵ دقیقه وقت نیاز دارد (۲۴).

فناوری ریز آرایه (Microarrays)

با فناوری ریزآرایه برای تشخیص GMO ، اهداف GM توسط PCR تقویت می‌شوند، با استفاده از آغازگرهای هدف خاص و/ یا عمومی، قبل از هیبریداسیون در آرایه، امکان شناسایی همزمان بیش از ۲۵۰۰۰۰ هدف در یک آزمایش وجود دارد. این روش در مقایسه با qPCR ، توان عملیاتی بسیار بالاتر اما حساسیت کمی ضعیف‌تر ارائه می‌دهد (۲۲).

فناوری لومینکس (Luminex Technology)

نمونه‌های هدف بیوتینی شده از طریق آزمایشات تکی یا چندگانه PCR تقویت شده می‌تواند توسط فناوری لومینکس مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. به طور طبیعی این نمونه‌ها با استفاده از ست‌های متفاوت که به طور مستقل نوکلئیک اسیدها را کنار هم جفت می‌کند، توانایی کشف همزمان ۵۰۰ نمونه هدف متفاوت را تنها در یک نمونه آزمایشگاهی دارند. بعد از ترکیب کردن الیگونوکلئوتیدهای بیوتینی شده برای گزارش وضعیت هر ست، دستگاه خواننده به طور مستقل هر میکروسفر را از طریق سیتومتری با لیزرهایی به قطر ۶۳۵ تا ۵۳۲ نانومتر مورد بررسی قرار می‌دهد و حضور یا عدم حضور نمونه هدف را شناسایی و اندازه‌گیری می‌کند (۲۲).

با توجه به کیفیت مرغوب محصول به دست آمده از طریق تکنولوژی لومینکس به نظر می‌رسد این فناوری به طور مداوم در کشف ارگانیسم‌های تراریخته به کار گرفته شود. مواد استفاده شده در این فناوری دقیق‌تر و سریع‌تر از سیستم میکروواری عمل می‌کنند. تاکنون فقط چند پژوهش برای کشف ارگانیسم‌های تراریخته از این تکنولوژی استفاده کرده‌اند. آزمایش‌های بر روی این تکنولوژی همچنان ادامه خواهد داشت تا

سیستم معتبرتر و تاثیرگذارتری را به‌وجود آورد (۲۲).

فناوری دیجیتال qPCR

در حال حاضر qPCR برای تجزیه و تحلیل کمی مولکولی GMOs در محصولات استفاده می‌شود. با این حال، استفاده از آن برای تشخیص و تعیین تعداد بسیار کمی از دی.ان.ای هدف، مانند برخی از ماتریکس‌های غذایی پیچیده و خوراکی، محدود است. برای حل مشکلاتی که در بخش کمی qPCR به وجود آمد، به‌خصوص وقتی که تعداد ارگانیسم‌های تراریخته کم بودند و مهارکننده‌های PCR فعال می‌شدند فناوری دیجیتال PCR (dPCR) در کشف ارگانیسم‌های تراریخته مورد آزمایش قرار گرفت.

براساس توابع بینومیال پواسیون، هر بخش از شکستگی تابع به‌عنوان مثبت (کشف نمونه هدف تقویت شده) و منفی (عدم کشف نمونه هدف تقویت شده) از طریق فناوری dPCR بیان می‌شود. این تکنولوژی این امکان را می‌دهد تا نمونه‌های هدف نوکلئیک اسیدهای ارگانیسم‌های تراریخته در هر نمونه اندازه گیری شود. دو روش برای تحقق این هدف وجود دارد. یکی از آن‌ها روش cdPCR است که نمونه آزمایشگاهی را به چندین هزار بخش از میکروفلویدیک‌ها تقسیم می‌کنند.

از این استراتژی برای پوشش گسترده ارگانیسم‌های تراریخته استفاده می‌کنند. روش دیگر ddPCR است که نمونه آزمایشگاهی را به چندین هزار قطره که توسط امولسیون آب-روغن ساخته شده است؛ تقسیم می‌کنند. فناوری dPCR می‌تواند به یک راهکار کلیدی در زمینه کشف ارگانیسم‌های تراریخته تبدیل شود. به لطف تقسیم‌بندی نمونه‌های آزمایشگاهی احتمال تحت تاثیر قرار گرفتن PCR به وسیله مهارکننده‌ها کاهش پیدا می‌کند و این امکان را می‌دهد تا ثبت داده‌های بی‌اثر را کاهش دهد. هرچند که روش‌های معتبر qPCR به آسانی قابل انتقال به تکنولوژی dPCR نیستند (۲۲، ۲۵، ۲۶).

فنـــاوری Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

به دلیل سرعت، ویژگی، حساسیت و سادگی، روش LAMP برای شناسایی GMOها پیشنهاد شده است. علاوه بر این ویژگی و حساسیت بالا، مقرون به صرفه بودن و کمبود تجهیزات لازم برای آزمایش LAMP اجازه می‌دهد تا این روش در تجزیه و تحلیل محصولات بسیار فرآوری شده مفید باشد. در این روش ۴ پیوند نخستین در ۶ ناحیه متفاوت از نمونه هدف مورد نیاز است. این روش این اجازه را می‌دهد تا در شرایط ایزوترمال، هدف، با استفاده از رنگ‌های فلورسنس به‌طور مستقیم قابل مشاهده باشد. استراتژی LAMP این مزیت را دارد که می‌تواند مهارکننده‌های متعدد PCR مانند پلی‌ساکاریدهای اسیدی را خنثی کند. برای اجرای این استراتژی لزوماً به دستگاه‌های پیشرفته و سطح بالا احتیاج نیست بلکه می‌توان از حمام آب یا بلوک حرارتی استفاده کرد. ساختار ۴ پیوند نخستین نمونه هدف که هرکدام دقت و حساسیت بالایی را متحمل می‌شوند در استراتژی LAMP می‌تواند دشوار باشد. درنتیجه شناسایی نمونه‌های هدف متعدد تراریخته با روش آزمایش‌های چندگانه میسر نیست (۲۲، ۲۷، ۲۸).

DNA Walking

Genome walking یک روش مولکولی برای شناسایی مستقیم توالی نوکلئوتیدی از ژنوم‌های خالص است. در استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR، نتایج مشاهده شده بیشتر عناصر حاصل از ارگانیسم‌های طبیعی را مشخص می‌کند. بنابراین، آن‌ها صرفاً یک اثبات غیرمستقیم از وجود GMO در ماتریکس‌های غذایی/ خوراکی آزمایش شده هستند. وقتی که سیگنال‌های گزارش شده با سیگنال‌های شناخته‌شده از ارگانیسم تراریخته مطابقت نداشته باشد، وجود یک ارگانیسم تراریخته ناشناخته را گزارش می‌دهد که حداقل دارای یک المان شناخته شده است. تنها راهی که برای تایید قطعی وجود ارگانیسم تراریخته وجود دارد، از طریق تولید ساختار پیوندهای غیرطبیعی

المان‌های تراژنی همانند ساختار پیوندهای بین تراژن‌ها و ژنوم گیاه صورت می‌گیرد (۲۲).

برای به دست آوردن این اطلاعات مهم، چندین استراتژی از DNA walking، که به آن genome walking نیز گفته می‌شود، گزارش شده است. به طور دقیق‌تر این روش مولکولی این امکان را فراهم می‌سازد که توالی نوکلئوتیدهای جفت در بخش‌هایی از دی.ان.ای شناخته شده در هر ژنومی با استفاده از ترکیب پیوندهای نخستین شناخته‌شده به روش DNA walking، شناسایی شوند. سپس محصول حاصل شده از PCR با تکنولوژی Sanger مرتب می‌شود تا در نهایت با اطلاعات موجود (به‌عنوان مثال NCBI و JRC GMO-Amplicons) مورد بررسی قرار گیرد (۲۲، ۲۹،۳۰).

فناوری چرخه نسل بعدی (Next Generation Sequencing Technologies)

برخلاف نتیجه بهتری که نسبت به qPCR می‌دهد، لازم است که برای استفاده از استراتژی‌های چندگانه حداقل نسبت به بخشی از ارگانیسم تراریخته با اطلاعات قبلی وجود داشته باشد. تکنولوژی NGS از نظر سرعت و بازده، بهتر از توالی کلاسیکی Sanger است. بازده قوی NGS به‌طور همزمان نمونه‌های متفاوتی را در طیف گسترده‌ای از بارکدها ارائه می‌دهد (۲۲).

توالی‌یابی هدفمند (Targeted Sequencing)

استراتژی توالی‌یابی هدفمند به‌طور ویژه‌ای برای ژنوم گسترده و پیچیده که درگیاهان کشف شد، مفید است. با اینکه مقدار کمی از اطلاعات قبلی برای مطالعه توالی‌یابی‌های هدفمند مورد نیاز است، مزیت استفاده از تمام انرژی در زمینه‌های زمان و اقتصاد در بخشی از نمونه مورد نظر وجود دارد. با این فناوری دو روش قابل استفاده است، استفاده از دی.ان.ای محصولات PCR (توالی امپلیکون) یا استفاده از بخشی از دی.ان.ای ژنوم (توالی غنی‌سازی نمونه هدف). برای کشف ارگانیسم‌های تراریخته، امپلیکون های تولید شده به‌وسیله PCR با اولین هدف‌گیری ژن اندوژن، ژن Bt176، ژن

Bt11 در ذرت و ژن انـدروژن، سـاختار S/CTP4۳۵، المـان CP4-EPSPS، فعـال کننده p35S و مهارکننده tNOS در سـویا، از نمونه‌ها شـامل مقـدار کمـی از ژنتیـک اصـلاح شـده هسـتند. سـپس هرکـدام از امپلیکون‌ها به صورت مستقل با استفاده از سیستم ۴۵۴ به نـام pyrosequencing بـر روی دیودهای حساس به نور قابـل حمـل بـه‌ترتیـب بیولومینسـنس کـه حسـاس‌تـر، فشـرده‌تـر و مقـرون بـه صـرفه‌تـر از تکنولـوژی اصـلی ۴۵۴ اسـت، مرتـب می‌شـوند.از طرفـی دیگـر بخشـی از توالی‌یـابی هدفمنـد شـامل گزینـه‌هـای منتخبـی از تمـام دی.ان.ای ژنـوم نمونـه هدف است. بـرای بـه‌دسـت آوردن آن‌هـا روش‌هـای ترکیـب مناسـبی براسـاس سـاختمان مغناطیسـی یـا میکـرواری‌هـای وابسته‌ای همراه با ساختار ویـژه می‌توانـد مـورد اسـتفاده قـرار بگیـرد. بخشـی از دی.ان.ای موردنظر شامل تمام یا بخشی از موارد شناخته شده است که می‌توانند کنار هم قرار گیرند و تـوالی را تشـکیل دهنـد (۲۲، ۳۱).

توالی‌یـابی کلـی ژنـوم (Whole Genome Sequencing)

بـا روش WGS مـی‌تـوان نمونـه‌ای را بـدون اطلاعـات قبلـی مشـخص کـرد. در ابتدا وقتی هیچ اطلاعاتی در مورد تراژن‌ها موجود نباشد، نمونـه هـدف و تراژن‌هـای آن با تمام آزمایشات و مطالعات مشابه یـا غیر مشابه ژنوم اصلی گیاه مورد بررسی و شناسـایی قـرار می‌گیرنـد. پـس از اعـلام نتایج، اطلاعـات بـه‌دسـت آمـده سـاختار GMO ناشـناخته را بـه ثبـت مـی‌رسـاند. سـپس آن تـوالی کـه حـداقل یـک المـان تراژنی شناخته شده باشد، بـه وجـود مـی آید. نمونه هدف همراه بـا گزارشـاتی کـه مـرتبط یـا غیرمـرتبط بـا تـوالی تـراژن دی.ان.ای که شامل المان‌های تراژنـی کـه اخیراً استفاده شـده هسـتند، از اول جمـع آوری می‌شود. در آخر اگـر تـوالی نمونـه هدف شناخته شده باشد، دو نوع گـزارش تجربی به دست می‌آید. اول گزارشاتی که کاملا به ژنوم مرجع بی‌ربط هستند، توسط توالی تراژنی ترجمـه می‌شـوند تـا تعـداد نمونه‌های هدف را در نواحی تراژن اندازه گیـری کننـد. دوم مقایسـه گزارشـات بـا

توالی نمونه هدف مرجع امکان کشف ارگانیسم‌های تراریخته در یک نمونه را فراهم می‌کند. موفقیت این استراتژی با در دسترس بودن ژنوم‌های مرجع مناسب برای گونه‌ها و ارگانیسم‌های خاص مرتبط است (۲۲).

روش‌های تشخیص بر اساس پروتئین

الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ELISA)

انجام روش‌های PCR به زیرساخت‌های آزمایشگاهی گران و کارکنان باتجربه نیاز دارند. در چنین مواردی، روش‌های مبتنی بر پروتئین ممکن است به‌عنوان یک آزمایش ارزان و آسان جایگزینی مناسب به‌خصوص برای آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت در انجام نظارت مورد استفاده قرار گیرند. ELISA پرکاربردترین روش مبتنی بر پروتئین برای تشخیص پروتئین‌های بیان‌شده توسط GMO به‌خصوص در مواد غذایی خام است. همچنین این روش یکی از روش‌های رایج برای به‌دست آوردن اطلاعات در مورد وجود یک ماده آلرژیک در ماتریکس‌های غذایی پیچیده است. ELISA می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین برای تشخیص قارچ‌ها باشد که امکان تجزیه و تحلیل چندین نمونه را در یک آزمون واحد فراهم می‌کند و به معرف‌های سمی احتیاج ندارد. علاوه بر این، الایزا حتی پس از عملیات حرارتی می‌تواند وجود قارچ‌ها را در مواد غذایی تشخیص دهد، که این امر امکان ارزیابی آلودگی در غذاهای فرآوری شده را فراهم می‌آورد. ELISA به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی قارچ‌های بیماری زا نیز بکار می رود. در این روش از آنتی‌بادی‌هایی استفاده می‌شود که مخصوص برخی پروتئین‌ها هستند و می‌توانند پروتئین مورد نظر را از میان هزاران پروتئین غیرهدف تشخیص داده و به آن متصل شوند (۴، ۳۲، ۳۳، ۳۴).

فناوری نوارهای جریان جانبی Lateral Flow Strips (LFS)

فناوری LFS تقریباً شبیه به ELISA است. اما در این روش آنتی‌بادی‌ها روی یک تکه نوار و در جای خاصی ثابت و

ساکن شده‌اند. نوارهای جریان جانبی به صورت کیت‌های آماده وجود داشته و نیاز به امکانات خاصی ندارند و کار با آن‌ها بسیار آسان است. این روش برای تشخیص در محل و یا مزرعه و تشخیص بیماری‌های زراعی بسیار مناسب است. این روش فقط در ۱۰ دقیقه تکمیل می‌شود و نیازی به تجهیزات گسترده رنگ‌آمیزی ندارد. ترکیب این روش با روش‌های دیگر، روند آزمایش را ساده‌تر می‌کند. انجام کل آزمون در دمای اتاق در ۵-۱۰ دقیقه امکان‌پذیر است.

این روش مطابق با شرایط تشخیص سریع GMOها است و نیازی به یک چرخه حرارتی پیچیده ندارد، که برای آزمایش میدانی مناسب است (۴، ۳۵، ۳۶).

روش تشخیص براساس ذرات مغناطیسی

در این روش نیز از آنتی‌بادی‌ها برای تشخیص پروتئین هدف استفاده می‌شود. پروتئین‌های خاص در داخل با استفاده از ذرات فلزی که دارای پوشش از آنتی‌بادی‌ها هستند، هدف‌گیری شده و در نهایت توسط یک آهنربا از داخل محلول جداسازی می‌شوند. مزیت این روش این است که ذرات آنتی‌بادی بجای ثابت بودن در جای خاص در سطح محلول پراکنده بوده و می‌توانند پروتئین هدف را به خوبی شناسایی کنند (۴).

فهرست منابع References

۱. توکلی م. (۱۳۹۱). فرآورده‌های غذایی تراریخته، چالش‌ها، موانع و مزایا. سمینار ملی امنیت غذایی. ص.۱۰-۱۷.

۲. شجیع ا. م.، گواهی و. و صفاری م. (۱۳۹۴). بررسی جنبه‌های مختلف گیاهان تراریخته. همایش بیوتکنولوژی. ص.۱۳-۱۶.

۳. هاشمی م. و شجاع الساداتی ع. (۱۳۸۷). مواد غذایی اصلاح شده ژنتیکی، فرصت‌ها و چالش‌ها. فصلنامه علوم و صنایع غذایی.

4. ISO 21569: 2005+Amd 1. (2013). Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Qualitative nucleic acid based methods.

5. Jamea C. (2007). Global status of commercialized biotech/GM food, International service for the acquisitin of agri-biotech application. P. 4-9.

6. . Uzogara S.G. (2000). The impact of genetic modification of human foods in the 21st century. Biotechnology Advances.Vol.18, P.179-206.

7. Herzallah S.M. (2012). Detection of genetically modified material in feed and foodstuffs containing soy and maize in Jordan. Food Composition and Analysis.Vol. 26, P. 69-172.

8. Khan A., Khan N., Minhas N.M., Rabbani M.A. and Ghafoor A. (2014). Diversity in seed storage proteins in maize genetic resources: i. variation in alcohol soluble zein protein fraction. International Journal Agriculture Biology. Vol. 16.

9. Koppel R., Bucher T., Frei A. and Waiblinger H.U. (2015). Droplet digital PCR versus multiplex real-time PCR method for the detection and quantification of DNA from the four transgenic soy traits MON87769, MON87708, MON87705 and FG72, and lectin. European Food Research and Technology. vol.241,no.4, pp. 521–527.

10. Nikolic Z., Ajdukovic K., Jevtic A. and Marinkovic D. (2009). Detection of GM soybean in food products by simultaneous employment of three pairs of PCR primers, Food Research International. P. 349-352.

11. Yun He X. and et al. (2009). A 90 day toxicology study of transgenic lysine-rich maize grain (Y642) in sprague-dawley rats. Food and Chemical Toxicology.Vol. 47,P. 425-432.

12. Koenig R. (1999). European researchers grapple with animal rights. Science. P. 1604-1610.

13. Vijayakumar K.R., Martin A., Gowda L.R. and Prakash V. (2009). Detection of

genetically modified soya and maize impact of heat processing. Food Chemistry. Vol. 117, P. 514-521.

14. Costa J., Mafra I., Amaral J.S. and Olivera M.B.P.P. (2011). Monitoring genetically modified soybean along the industrial soybean oil exrtaction and refining processes by polymerase chain reaction techniques. Food Research International. vol. 43, P.301-306.

15. Fredrickson D.S. (1979). A history of the recombinant DNA and genetic experimentation, pergamon press. P. 151-156.

16. DIN EN 12305. (1999). Biotechnology Modified organisms for application in the environment Guidance for the sampling strategies for deliberate releases of genetically modified plants.

17. ISO 24276:2006 + AMENDMENT1 ISO 24276. (2013). Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- General requirements and definitions.

18. ISO 21571:2005+ AMENDMENT1 ISO 21570. (2013). Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products nucleic acidextraction.

19. Margarit, E., Reggiardo, M.I., Wallejos, R.H. and Permingeat, H.R. (2006). Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. Food Research International. Vol. 39, P. 250-255.

20. Li Z., Yu-Hua W., Jun L., Wei L., Biao L. and Gang W. (2016). A self-probing primer PCR method for detection of very short DNA fragments. Analytical Biochemistry.

21. Kralik P. and Ricchi M. (2017). Basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. Frontiers in Microbiology.

22. Marie-Alice Fraiture and et al. (2015). Current and new approaches in gmo detection: challenge and solution. BioMed Research International. Vol 2015, 22 pages.

23. Sean C. Taylor and et al. (2019). The Ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. Trends in Biotechnology. Vol. 37, No. 7.

24. Xiao Zhao, and et al. (2019). Multiplex detection of transgenic maize by microdroplet PCR combined with capillary gel electrophoresis. Acta Biochimica et Biophysica Sinica.

25. Morisset D. and et al. (2013). Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. PLOS ONE. Vol.8, No.5.

26. Philips S.C. (1994). Genetically engineered foods: do they pose health and environmental hazards? CQ researcher. Vol. 4, P. 643-960.

27. Kiddle G., Hardinge P., Buttigieg N. and et al. (2012). GMO detection using a

bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. BMC Biotechnology. Vol.12.

28. Cheng Y., Zhang M., Hu K. and et al. (2014). Loop-mediated isothermal amplification for the event-specific detection of wheat B73-6-1. Food Analytical Methods. Vol.7, No.2, pp.500–505.

29. Leoni C., Volpicella M., De Leo F., Gallerani R. and L. R. Ceci. (2011). Genome walking in eukaryotes. FEBS Journal. Vol.278, No.21, pp. 3953–3977.

30. Fraiture M.A., Herman P., Taverniers I., DeLoose M., Deforce D. and Roosens N.H. (2014). An innovative and integrated approach based on DNA walking to identify unauthorised GMOs. Food Chemistry.Vol.147, pp.60–69.

31. Song Q., Wei G., and Zhou G. (2014). Analysis of genetically modified organisms by pyrosequencing on a portable photodiode-based bioluminescence sequencer. Food Chemistry. Vol.154, pp.78– 83.

32. Aline Myuki Omori and et al. (2019). Development of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect fusarium verticillioides in poultry feed samples. Toxins. Vol. 11, No. 48.

33. Dimitra M. and et al. (2019). Evaluation of a Real Time PCR Assay and an ELISA Method for the Detection of Walnuts and Almonds Allergen Traces in Food Products. Journal of Food Research. Vol. 8, No. 3.

34. Ozge Ozgen Arun, Funda Yilmaz Eker, Karlo Muratoglu. (2018). The effect of processing factors on detection of genetically modified soy in flour by ELISA assay. Journal of Istanbul Veterınary Scıences. Vol 2, Issue: 2.

35. Hua L. and et al. (2020). Rapid detection of P–35S and T-nos in genetically modified organisms by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip. Food Control, Vol 107.

36. Yun-mu Zhang, Ying Zhang and Kabin Xie. (2020). Evaluation of CRISPR/Cas12a-based DNA detectionfor fast pathogen diagnosis and GMO test in rice. Molecular Breeding. Vol 40, No 11.

37. Egret M. and Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptoatic for oxidative stress in leaves of chives. Environmental and Experimental Botany. Vol. 48, P. 43-49.

38. Mukhlesur R.M.D. and Hirata Y. (2004). Genetic diversity in brassica species using SDS_PAGE analysis. Biotechnology Sciences. Vol. 4, P. 234-238.

Transgenic Products and New Methods to Identify Them

Masoumeh Atharinia

National Organization for Standardization, Standard Research Institute, Food and Agriculture Research Institute, Microbiology Department.

atharinia_m@yahoo.com

Abstract:

Due to population growth in the coming years, adequate food supply is the world's biggest problem, and it seems that one way to meet this need is to produce transgenic products. Transgenic products are created using modern technology to create or enhance a desirable property, such as increasing resistance to weeds or improving nutritional properties. The advantages of transgenic products include their resistance to pests, diseases and non-biological stresses. Given that Iran is one of the countries that is a member of the International Biosafety Protocol and the competent legal authorities are responsible for detecting transgenic items and assessing their safety, therefore, identifying and examining the safety of these products is of particular importance. In this paper, we have tried to examine the new methods of identifying and tracking transgenic processes.

Keywords: Transgenic, Genetic Engineering, New Methods, GMO.