مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹
ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

تشخیص موجودات تراریخته و محصولات آنها بر اساس روش‌های ایمونواسی

سعید سهیلی‌وند

استادیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

soheilivand@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۲۱، تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۴
صفحه ۴۲-۲۵

چکیده

تولید ارگانیسم‌های تراریخته (GMOها)، اعم از گیاهان، جانوران و ریزسازواره‌ها، در سه دهه اخیر رونق یافته است. ارگانیسم‌های تراریخته، فرصت‌هایی را برای بالا بردن کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی، افزایش کیفیت تغذیه، مدیریت پایدار آفات، علف‌های هرز و بیماری‌ها، کاهش هزینه‌های تولید مواد غذایی و دارو، بهبود سلامت عمومی و علاوه بر آنها، افزایش کیفیت زندگی، باعث شده‌اند. همچنین پیشرفت‌های موجود در این زمینه، به‌طور گسترده‌ای موجب درک وسیع و شگرفی در مورد اطلاعات ژنومی ارگانیسم‌های تراریخته شده است. با رواج روزافزون GMOها، برای بسیاری از کشورها و شرکت‌ها، ممکن است این نیاز احساس شود که آزمون‌هایی را برای تشخیص ارگانیسم‌های تغییریافته یا محصولاتشان انجام دهند. تشخیص و برچسب‌گذاری گیاهان تراریخته به محققان، کشاورزان، تامین‌کنندگان، مصرف‌کنندگان و همچنین آزمایشگاه‌های مرجع تشخیص GMO کمک می‌کند تا ماهیت ژنتیکی آنها را در هر مرحله‌ای از تحقیق، تولید و یا حمل و نقل ردیابی و متمایز کنند. هدف از مطالعه مروری حاضر، ارائه روش‌های ایمونواسی مبتنی بر آنتی‌بادی، برای تشخیص GMOها و پروتئین‌های نوترکیب آنها، است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی، اپی‌توپ، پروتئین نوترکیب، برچسب‌گذاری.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

مقدمه

امروزه با گسترش روش‌های پیشرفته مهندسی ژنتیک و بیوانفورماتیک، امکان دست‌ورزی ژنتیکی و تولید انواع مختلف پروتئین‌های نوترکیب وجود دارد. پیشرفت‌های حاصل در زمینه‌هایی همچون تولید داروهای نوترکیب و تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب در صنعت و زراعت ملکولی (molecular farming)، سبب شده تا به دنبال آن، توسعه روش‌های مختلف برای پایش پروتئین‌های نوترکیب در موجودات دستورزی شده و محصولات آنها و حتی درون یک تک سلول، بیشتر احساس شود (Peterson et al, 2017). همچنین تولید و کشت گیاهان تراریخته و لزوم تشخیص و برچسب‌زنی آنها در برخی از نقاط دنیا، باعث توسعه روش‌های مطمئن و متنوعی برای ردیابی GMOها شده است (Thangadurai et al, 2020). به‌طور کلی اساس تمامی روش‌های تشخیص، یا مبتنی بر دی.ان.اِ و یا پروتئین‌های نوترکیب آنها و یا ترکیبی از هر دو، بنا شده است که معروفترین آنها روش‌های تشخیص موجودات تراریخته بر پایه PCR است (Salihah et al, 2016). روش‌های متنوعی مبنی بر تشخیص پروتئین‌های نوترکیب و ردیابی آن در مراکز تحقیقاتی مختلف و آزمایشگاه‌های مرجع در سراسر دنیا، استفاده می‌شود. اگر هدف ردیابی و برآورد میزان پروتئین نوترکیب بیان‌شده در موجودات تراریخته یا فراورده‌های حاصل از آنها باشد، بهترین گزینه استفاده از روش‌های متنوع ایمونواسی است که در طیف وسیعی از تحقیقات و بررسی پروتئین‌های نوترکیب بکار می‌رود (Malik et al, 2018).

هر کدام از روش‌های ذکرشده چه بر پایه تشخیص دی.ان.اِ و چه بر پایه تشخیص پروتئین، می‌توانند مکمل هم بوده و همدیگر را تأیید کنند. علم ایمونولوژی و شناخت آنتی‌بادی‌ها با دو کشف اساسی و بارز در اواخر قرن نوزده، آغاز شد. اولین کشف توسط Elias Metchnikff انجام شد که سلول‌های فاگوسیتیک (phagocytic cells) را شناسایی کرد. دومین رویداد مهم، با کارهای علمی Emil Behring و Paul Ehrlich انجام شد که آنتی‌بادی‌ها را، عامل خنثی‌کننده سم‌های میکروبی معرفی کردند (Kaufmann, 2017).

این دستاوردها، سبب توسعه روزافزون در تحقیقات ایمونواسی شده و تا به امروز تکوین روش‌های مختلف و کاربرد آن در زمینه‌های گوناگون ادامه دارد. اساس این آزمون‌ها بر خصوصیت منحصر به‌فرد و یگانه هر آنتی‌بادی در تشخیص اپی‌توپ خاص از یک آنتی‌ژن، همچون

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

قفل و کلید اختصاصی، بنا نهاده شده است و این امکان را فراهم می‌کند تا بتوان یک ملکول زیستی خاص را، از بین ماتریکسی از ملکول‌ها، ردیابی و شناسایی کرد (Kaufmann, 2019).

هدف از این مطالعه معرفی و مرور روش‌های کاربردی و مهم ایمونواسی در تشخیص پروتئین‌های نوترکیب موجودات تراریخته و محصولات مشتق شده از آنها است. در قدم اول، برای درک و مقایسه بهتر انواع آزمون‌های ایمونواسی، اشاره مختصری به مفاهیم، اصول و اجزای بنیادین آزمون‌ها شده و در مرحله بعدی، اساس مهمترین روش‌ها و مزایا و هدف از استفاده آنها در شناسایی پروتئین‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفته است.

ایمونواسی، اصول و ملزومات آزمون‌ها

واژه ایمونواسی (immunoassay) در منابع مختلف و لغت‌نامه‌های فارسی، تحت عناوینی همچون؛ عیارسنجی زیستی، ایمن‌آزمونی و ارزیابی ایمنی شناخته شده که به‌طور معمول از لحاظ معنایی با اصطلاحات علمی دیگر همپوشانی دارد (Forutan, 2016). فارغ از عبارات مختلف و مشابه، ایمونواسی، در اصل نوعی شبیه‌سازی از فرآیند پاسخ آلرژیک بدن، به ماده بیگانه واردشده به آن است. در این حالت سیستم ایمنی، ماده خارجی را به عنوان آنتی‌ژن شناسایی کرده و آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید می‌کند که قابلیت شناسایی و مقابله با آن را دارد. بسیاری از روش‌های مختلف ایمونواسی، بر همین مبنا – اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن- بنا نهاده شده و برای کاربردهای بسیار متنوع در علوم زیستی و تشخیصی توسعه یافته‌اند (Ganjilikhani and Ziaee, 2018). از خصوصیات بنیادی واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، اختصاصی‌بودن واکنش بین آنها است. همین ویژگی اصلی و مهم آنتی‌بادی‌ها، باعث شده تا بتوان از آنها در بسیاری از علوم برای شناسایی و سنجش پروتئین‌های طبیعی و یا انتقال هدفمند دارو و مواد، به‌صورت پایدار و مطمئن استفاده کرد. علاوه بر این، یکی دیگر از کاربردهای موثر آزمون‌های ایمونواسی، تشخیص، ردیابی و اندازه‌گیری پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در میکروارگانیسم‌ها و یا موجودات تراریخته است (Ramos-Martinez et al, 2017; Zhou et al, 2016).

آنتی‌بادی، آنتی‌ژن و اپی‌توپ

عامل کلیدی در تمامی روش‌های ایمونواسی، انواع مختلف آنتی‌بادی‌ها هستند. آنتی‌بادی‌ها در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

تمامی حوزه‌های زیستی اعم از تحقیقات پزشکی (Kamle et al, 2019)، دارویی (Thomas et al, 2019)، صنایع غذایی (Ahmed et al, 2020) دامپزشکی و دامپروری (Ducrotoy et al, 2018)، کشاورزی (Liu et al, 2018)، شیلات (Cinquanta et al, 2017) و محیط‌زیست (Li et al, 2017) کاربرد وسیعی دارند.

قبل از ورود به انواع روش‌های ایمونواسی درگیر در ردیابی پروتئین‌ها، مروری کلی بر روی عناصر کلیدی و تعاریف اولیه، می‌تواند به درک بهتر و توانایی هر یک از روش‌های ایمونواسی، کمک کند.

شاید بتوان به جرات گفت که یکی از عناصر کلیدی و پراهمیت در تمامی روش‌های ایمونواسی، آنتی‌ژن است، پروتئینی (یا به‌طور کلی ملکولی) که آنتی‌بادی به‌طور اختصاصی به آن متصل می‌شود و آنتی‌بادی یا آنتی‌سرم گروه هتروژنی از گلیکوپروتئین‌ها هستند که توسط لنفوسیت‌های B تولید و در خون یا بافت‌ها ترشح می‌شوند. البته در کنار آنتی‌بادی‌های طبیعی، آنتی بادی‌های نوترکیب و مهندسی‌شده نیز وجود دارند که خصوصیات مشابهی همانند آنتی‌بادی‌های طبیعی در اتصال به آنتی‌ژن دارند. بخشی از آنتی ژن که به جایگاه اتصال آنتی‌بادی (پاراتوپ paratope) متصل می‌شود، اپی‌توپ، یا شاخص آنتی‌ژنیک نامیده می‌شود. ویژگی اتصال اختصاصی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن و قدرت آن در تمامی ایمونواسی‌ها، به میزان میل ترکیبی (affinity) این دو نوع ناحیه پاراتوپ و اپی‌توپ بستگی دارد (Rahbarizadeh et al, 2019).

اساس و مراحل اصلی آزمون‌های مبتنی بر ایمونولوژی

انواع روش‌های ایمونواسی براساس هدف و نوع انجام آن ابداع شده‌اند که با هم تفاوت‌های اساسی دارند. ولی در اساس می‌توان کل فرآیند در همه آنها را به دو بخش عمده "اتصال آنتی‌بادی به اپی توپ خاص" و "ردیابی، تشخیص و سنجش آزمون" دسته‌بندی کرد.

۱. اتصال آنتی‌بادی به اپی‌توپ خاص

فرآیند اتصال و شدت و ضعف آن، به نوع آنتی بادی بکار رفته و میل ترکیبی آنتی‌بادی به اپی‌توپ آنتی‌ژن بستگی دارد. عامل بسیار مهم دیگر اختصاصیت اتصال است که بایستی آنتی‌بادی فقط به اپی‌توپ خاص بر روی یک آنتی‌ژن خاص اتصال یابد تا پدیده پس‌زمینه (background) رخ نداده و یا به حداقل برسد. انتخاب آنتی‌بادی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

مناسب برای هر آزمون ایمونواسی، ضامن موفقیت آن است. اهمیت این موضوع چنان مهم است که برای کاهش هزینه‌ها و بررسی قدرت اتصال و اختصاصیت آنتی‌بادی، از روش‌هایی همچون ریزآرایه (microarray) برای غربال و شناسایی بهترین آنتی‌بادی‌ها، برای یک آنتی‌ژن مشخص استفاده می‌شود (Paul and Weller, 2020).

نوع آنتی‌بادی نیز بر اساس هدف و شرایط آزمون می‌تواند از سه دسته کلی آنتی‌بادی‌های پلی کلونال، مونوکلونال و یا نوترکیب انتخاب شود. تفاوت این سه دسته آنتی‌بادی به‌طور ساده، بدین صورت است که به مجموعه آنتی‌بادی‌های مختلف تولید شده توسط لنفوسیت‌های B متفاوت در برابر اپی‌توپ‌های گوناگون یک آنتی‌ژن، آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال گفته می‌شود.

هر یک از نوع‌های مختلف و منحصربفرد آنتی‌بادی پلی‌کلونال، به عنوان یک نوع آنتی‌بادی مونوکلونال در نظر گرفته می‌شود که یک اپی‌توپ خاص را بر روی آنتی‌ژن، شناسایی کرده و می تواند به آن اپی‌توپ خاص متصل شود. معمول‌ترین روش تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، استفاده از روش هیبریدوما است (Rüker, 2021). برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال باید دو سلول با هم ادغام شوند. یکی از سلول‌ها، تولیدکننده آنتی‌بادی و دیگری سلول نامیرا است. هیبرید این دو، باعث بوجود آمدن نوعی لنفوسیت نامیرا می شود که قادر است یک نوع آنتی‌بادی مونوکلونال را تولید کند.

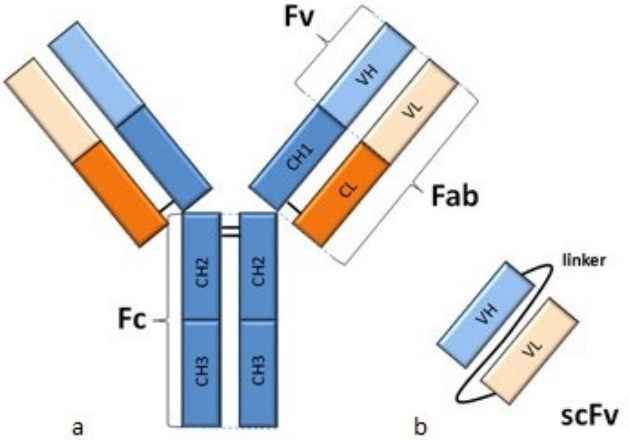
در مقابلِ آنتی‌بادی‌های کامل و طبیعی، آنتی‌بادی‌های نوترکیب قرار دارند که در آنها تاکید بیشتری، بر روی نواحی متغییر بوده و ساده‌ترین و متداول‌ترین آنها scFv (single-chain variable fragment) است که از ترکیب دومین‌های متغییر سبک VL و دومین متغییر سنگین VH که به کمک یک توالی کوتاه (linker) به هم متصل هستند، تشکیل شده است (شکل ۱).

تولید، تکثیر، نگهداری و غربال این کتابخانه‌های عظیم scFv، معمولا در حامل‌های مخصوص فاژی انجام می شود. این روش به تکنیک نمایش فاژی (phage display) معروف است (Falak et al, 2020; Rahbarizadeh, 2019).

در هر یک از آزمون‌های ایمونواسی برحسب هدف و شرایط و امکانات می‌توان از این سه نوع آنتی‌بادی پلی‌کلونال، مونوکلونال و نوترکیب استفاده کرد (جدول ۱).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]



شکل ۱- تصویر شماتیک از ساختار آنتی‌بادی a. قطعات مختلف یک آنتی‌بادی IgG و b. آنتی‌بادی نوترکیب scFv شامل قطعات VL و VH متصل به‌هم توسط یک توالی کوتاه (linker).

جدول ۱- مقایسه خصوصیات انواع آنتی‌بادی‌ها در آزمون‌های ایمونولوژیکی

خصوصیات	پلی‌کلونال	مونوکلونال و نوترکیب
پدیده پس‌زمینه (background)	به‌دلیل تنوع آنتی‌بادی‌ها و تعدد تشخیص اپی‌توپ‌ها این امکان وجود دارد که به پروتئین‌های غیرهدف متصل شده و سبب اختلال و بالا رفتن اثر پس‌زمینه شود	به‌دلیل شناسایی یک اپی‌توپ خاص دارای پس‌زمینه کمتری است. زیرا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و نوترکیب قادر به اتصال به یک اپی‌توپ خاص هستند
تمایل اتصال (binding affinity)	حتی اگر برخی از آنتی‌بادی‌ها دارای تمایل اتصال کمتری باشند. این نقیصه می‌تواند توسط آنتی‌بادی‌های دیگر (تنوع آنتی‌بادی) جبران شود	بایستی آنتی‌بادی دارای اختصاصیت و تمایل اتصال بالایی باشد در غیر اینصورت امکان دارد به‌دلیل تک‌نوع بودن، اتصال ضعیف رخ دهد
پایداری اتصال بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن	به‌طور ذاتی برهمکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌های متنوع بالا بوده و پایداری اتصال وجود دارد	در صورت پایداری کم اتصال، می‌توان از چندین آنتی‌بادی مونوکلونال و یا نوترکیب به طور همزمان، برای افزایش پایداری استفاده کرد

۲. ردیابی، تشخیص و سنجش آزمون‌ها

پس از انتخاب آنتی‌بادی مناسب و اطمینان از اتصال قوی و اختصاصی آن به آنتی‌ژن، بایستی این اتصال قابل شناسایی و ردیابی باشد. از عوامل تشخیصی متنوعی برای رصد اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن استفاده می‌شود. این عوامل به نوعی متصل یا همراه آنتی‌بادی بوده و بر حسب ماهیت‌شان، قادر به ظهور پیام‌های قابل دریافتی هستند که

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

محل حضور آنتی‌بادی و به دنبال آن محل آنتی‌ژن را آشکار می‌سازد. البته لازم به ذکر است که عوامل تولید کننده سیگنال به جای آنتی‌بادی می‌توانند بر روی آنتی‌ژن هم طراحی و استفاده شوند که به‌طور معمول کاربرد مورد اخیر، در ردیابی پروتئین‌های نوترکیب موجودات تراریخته، معمول نیست. این عوامل برحسب ماهیت و نوع تشخیص و ردیابی‌یشان به گروه‌های زیر تقسیم می‌شوند:

۱- عوامل تشخیصی رادیواکتیوی (radioactive detection)

روش‌های ایمونورادیولوژی (immunoradiologic methods) که به نام‌های رادیوایمونواسی (radio immuno assay; RIA) و ایمونورادیومتری (immunoradiometric assay; IRMA) نیز شناخته می شود و به‌دلیل اهمیت آن جایزه نوبل سال ۱۹۷۷ به Rosalyn Yalow اهداء شد. در این روش از عناصر رادیواکتیو با نیمه عمرهای مختلفی همچون ^{125}I (نیمه عمر ۶۰ روزه و اشعه گاما)، ^{131}I (نیمه عمر ۸ سال و اشعه‌های بتا و گاما)، ^{3}H (نیمه عمر ۱۲ سال و اشعه بتا)، ^{4}C (نیمه عمر ۵۷۶۰ سال و اشعه بتا) و ^{32}P (نیمه عمر ۱۴ روزه و اشعه بتا) استفاده می‌شود. این روش جزء قدیمی‌ترین روش‌ها بوده و امروزه بخاطر خطرهای مربوط به مواد رادیواکتیو و لزوم استفاده از تجهیزات خاص، ترجیحا از روش‌های دیگر و عوامل غیررادیواکتیو استفاده می‌شود. با این وجود، جزء روش‌های بسیار حساس و دقیق بوده که قادر است مقادیر بسیار کم آنتی‌ژن را ردیابی و شناسایی کند (Mir et al, 2020).

۲- عوامل تشخیص فلورسانس (fluorescence detection)

آشکارسازی در روش‌های فلورسانس (immunofluorescence; IF) به وسیله ماده فلورسنت یا فلورکروم به عنوان نشانگر انجام می‌شود. ساطع شدن نور فلورسانس یک پدیده فیزیکی است که مکانیزم آن با تحریک و انتقال الکترون‌های اوربیتال‌ها به لایه بالاتر یک ماده فلورکروم آغاز شده و هنگام برگشت الکترون‌ها به لایه اولیه، نور ساطع می‌شود. آشکارسازی می‌تواند به دو روش کیفی، توسط میکروسکوپ فلورسنت و یا کمّی، توسط دستگاه فلوری‌متر، ردیابی و سنجش شود. مزیت استفاده از این روش و آشکارسازهای آن، در روش‌هایی مانند ایمونواستینینگ فلوروسانس (fluorescent immunostaining)، با بکار بردن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

هم‌زمان چندین ماده فلورسنت با طول موج‌های مختلف، برای رصد چندین پروتئین، انجام می‌شود. در این حالت، می‌توان به راحتی پروتئین (های) نوترکیب و تاثیرات آنها بر دیگر پروتئین‌ها را در موجودات تراریخته، به‌طور همزمان بررسی کرد (Zhou et al, 2019).

۳- عوامل تشخیص کمی‌لومینسنس (chemiluminescence detection)

هر واکنش شیمیایی که انجام آن، نور تولید کند، جزء این دسته قرار می‌گیرد. هرگاه از این ویژگی به عنوان نشانگر در واکنش‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن برای سنجش و ردیابی استفاده شود، آن روش کمی‌لومینسانت ایمونواسی (chemi luminescennt immuno assay; CLIA) نامیده می‌شود. مواد گوناگونی از مشتقات لومینول، اکریدینیوم استر یا نیتروفنیل اگزالات می‌توانند برای این منظور استفاده شوند و وجود و شدت واکنش به‌وسیله دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری و با رسم نمودار، مقدار آنالیت (آنتی‌ژن) موجود در نمونه تعیین می‌شود. از مزایای این روش این است که جزء روش‌های نوین است و قابلیت کار با حجم بالای نمونه به‌صورت خودکار را دارد (Cinquanta et al, 2017).

۴- عوامل تشخیص ایمونوآنزیماتیک (immunoenzymatic)

یکی از متداولترین و معروفترین روش‌ها برای تشخیص‌های ایمونولوژیکی، روش ایمونوآنزیماتیک (immunoenzymatic) است. اساس این روش بر اتصال آنزیم به آنتی‌بادی (یا آنتی‌ژن) مورد نظر، قرار دارد. این آنزیم‌ها معمولا برای تشخیص پروتئین‌های نوترکیب، به آنتی‌بادی متصل می‌شوند. حضور آنزیم باعث عمل بر روی سوبسترا شده و با تولید و سنجش رنگ می‌توان، رابطه‌ای بین میزان حضور آنزیم (متصل به آنتی‌بادی) و به دنبال آن مقدار آنتی‌ژن موجود در نمونه را ارزیابی کرد. در برخی منابع به‌دلیل تولید رنگ در این روش، به آن رنگ‌سنجی (colorimetric) نیز گفته می‌شود (Signore et al, 2017). دو آنزیم معروف در روش ایمونوآنزیماتیک، عبارتند از فسفاتاز قلیایی (alkaline phosphatase; ALP) و آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (horseradish peroxidase; HRP). این دو آنزیم به‌طور گسترده‌ای برای سنجش میزان پروتئین هدف استفاده می‌شوند. از جمله سوبستراهای رنگ‌زا که برای واکنش‌های مبتنی بر آنزیم در روش‌های ایمونواسی استفاده می‌شوند، می‌توان به تترامتیل بنزیدین (TMB)،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

O- فنیل دی آمین دی هیدروکلراید (OPD) و P- نیتروفنیل فسفات (pNPP) اشاره کرد (Ganjilikhani and Ziaee, 2018).

انواع روش‌های ایمونواسی جهت شناسایی تراریخته‌ها

همانطور که اشاره شد، تمامی انواع روش‌های ایمونواسی بر دو رکن اساسی اتصال مناسب آنتی‌بادی به آنتی‌ژن و روش صحیح ردیابی و تشخیص این اتصال، طراحی شده‌اند و تفاوت بین روش‌ها، در هدف و مراحل اجرای آنها است. روش‌های ایمونواسی انواع گوناگونی داشته که در زمینه‌های مختلف علمی و بخصوص پزشکی، تشخیصی و آزمایشگاهی، کاربردهای بسیار گسترده‌ای دارند. در ادامه، روش‌هایی که در ردیابی تراریخته‌ها و تشخیص پروتئین‌های نوترکیب آنها استفاده می‌شوند؛ مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرند.

آزمون‌های الیزا (ELISA)

کلمه ELISA مخفف enzyme-linked immuno sorbent assay است. روش الایزا به‌دلیل کمّی بودن و دقت بالا در تشخیص پروتئین هدف، یکی از روش‌های پرکاربرد در تشخیص و ردیابی و سنجش میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب است. به‌طور مثال از این روش در تشخیص پروتئین نوترکیب CryIA(b)، در مواد غذایی و خوراک دام مشتق شده از گیاهان تراریخته استفاده می‌شود (Margarit et al, 2006). اساس الایزا بر ثابت نگه‌داشتن آنتی‌ژن مورد هدف و اضافه کردن آنتی‌بادی‌هایی که قابلیت اتصال به آن آنتی‌ژن را دارند، قرار دارد. همچنین در برخی موارد در اولین مرحله به جای آنتی ژن، آنتی‌بادی به سطوح جامد (چاهک پلیت)، متصل می‌شود. بنابراین روش الایزا بسیار انعطاف‌پذیر بوده و براساس هدف، نوع نمونه و روش انجام به انواع مختلفی قابل اجرا است. لازم به ذکر است که بین مراحل اجرا بایستی اجزایی که هیچ اتصالی نداشته و در محلول معلق هستند، با شستشوهای مکرر و دقیق حذف شوند. در آخر با ردیابی سیگنال حاصل و سنجش آن، به‌طور غیرمستقیم می‌توان میزان آنتی‌ژن (به‌طور مثال، پروتئین نوترکیب) را نسبت به شاهد برآورد کرد. به‌طور کلی دو روش اصلی ساندویچی (sandwich) و الایزای رقابتی (competitive ELISA) در تشخیص GMOها استفاده می‌شود که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود.

a. الایزای ساندویچی

این نوع الایزا از پرکاربردترین و دقیقترین‌ها است. در این روش از دو نوع آنتی‌بادی اولیه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

استفاده می‌شود که به‌صورت ساندویچی از دو طرف، به آنتی‌ژن متصل می‌شوند و برای ردیابی مقادیر کم و دقیق آنتی‌ژن در یک نمونه بکار می‌رود. در ابتدا، اولین آنتی‌بادی در چاهک‌های پلیت بارگذاری شده و پس از طی مراحل شستشو و بلوکه کردن، نمونه حاوی آنتی‌ژن یا پروتئین نوترکیب اضافه می‌شود. پروتئین‌های نوترکیب به‌طور اختصاصی به آنتی‌بادی اولیه متصل شده و پس از آن آنتی‌بادی دوم برای اتصال به پروتئین اضافه می‌شود و در مرحله آخر آنتی‌بادی سوم متصل به آنزیم برای اندازه‌گیری و برآورد پروتئین نوترکیب اضافه می‌شود. مزیت اصلی این روش در اختصاصی‌تر بودن و استفاده از دو نوع آنتی‌بادی اولیه است که باعث حذف معنی‌دار سیگنال‌های ناخواسته و غیراختصاصی شده و قادر است مقادیر کم پروتئین نوترکیب را، در نمونه ردیابی کند. لزوم استفاده از مراحل بیشتر در انجام آزمون و استفاده از آنتی‌بادی‌های مختلف از معایب این روش است. برای نمونه، برای غربال ذرت‌های تراریخته حاوی ژن *bar* از الایزای ساندویچی استفاده شده است. بدین صورت که در مرحله اول پروتئین نوترکیب ژن مربوطه در وکتور pET28a و در *Escherichia coli* BL21 (DE3) همسانه‌سازی شد. پس از یافتن آنتی‌بادی‌های مونوکلونال 4D5 و 3E8 بر علیه آن، آزمون الایزای ساندویچی برای غربال نمونه‌های تراریخته ذرت تولیدکننده فسفینوتریسین استیل‌ترانسفراز (phosphinothricin acetyltransferase; PAT) انجام و کارایی بالای الایزا با PCR تأیید شد. در انتها مشخص شد که با استفاده از آزمون الایزی ساندویچی و تهیه منحنی استاندارد آن، می‌توان پروتئین نوترکیب آن را، در نمونه‌های تراریخته، با دقت بالایی تشخیص داد (Liu et al, 2013). در مطالعه دیگری دامنه تشخیص آنتی‌بادی‌های مونوکلونال غربال شده بر علیه پروتئین‌های اعضای خانواده Vip3Aa (Vip3Aa8، Vip3Aa19 و Vip3Aa20)، در دو گیاه پنبه و ذرت تراریخته، نشان داد که به راحتی و با رسم نمودار استاندارد، میزان پروتئین‌های نوترکیب در هر یک از نمونه‌ها، قابل برآورد است (Liu et al, 2020).

b. الایزای رقابتی

اساس این روش بر رقابت بین پروتئین نوترکیب کونژوگه و پروتئین نوترکیب موجود در نمونه، برای اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی‌اش است که در چاهک میکروپلیت متصل شده است. بنابراین برای اندازه‌گیری پروتئین نوترکیب موجود در یک نمونه، از همان نوع پروتئین متصل‌شده به آنزیم، استفاده می‌شود. با این حساب، میزان رنگ یا نور

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

جذب‌شده از هر چاهک نسبت معکوس با غلظت پروتئین نوترکیب موجود در نمونه دارد. زیرا که رقابت بین دو پروتئین نشاندار استاندارد و پروتئین نوترکیب موجود در نمونه (غیرنشاندار)، برای اتصال به آنتی‌بادی، باعث می‌شود تا شدت سیگنالِ پایین‌تر، نشان از حضور بالای پروتئین نوترکیب نمونه (غیرنشاندار) باشد که توانسته به میزان بیشتری به آنتی‌بادی اتصال یابد. با وجود بالا بودن حساسیت تشخیص در الایزای ساندویچی، الایزای رقابتی حساس‌تر بوده و امروزه تمایل بیشتری برای استفاده از این تکنیک، جهت تشخیص GMOها و محصولات مشتق شده از آنها وجود دارد (Kamle et al, 2019). در تحقیقی با استفاده از روش الایزای رقابتی توانستند گیاهان سویا، کلزا و چغندرقند تراریخته مقاوم به glyphosate را شناسایی و غربال کنند (Khomenko et al, 2019).

وسترن بلات (Western blot)

این روش تشخیص، به‌دلیل تفکیک پروتئین‌ها بر روی ژل و انتقال آنها به کاغذ نیتروسلولزی (nitrocellulose) یا PVDF (polyvinylidene difluoride) و ارزیابی آنها بر اساس وزن ملکولی، با بقیه آزمون‌های ایمونواسی تفاوت دارد. برای تفکیک بهتر پروتئین‌ها، معمولا بجای توجه به بار الکتریکی ذاتی آن، وزن ملکولی آنها در نظر گرفته می‌شود و به همین منظور در بافرها و محتویات ژل، سدیم دو دسیل سولفات (sodium dodecyl sulfate: SDS) وجود دارد که تقریبا به نسبت یکسان و مشخصی به پروتئین‌ها متصل و باعث شارژ منفی آنها می‌شود. این امر، موجب حرکت و تفکیک راحت‌تر پروتئین‌ها در داخل ژل به سمت قطب مثبت شده و همین عامل تفکیک، زمانی که پروتئین‌های هم‌خانواده و اپی‌توپ‌های مشابه پروتئین نوترکیب در نمونه وجود داشته باشد، یک مزیت بسیار مهم محسوب می‌شود. زیرا که با تفکیک پروتئین‌ها و آگاهی از وزن ملکولی تقریبی پروتئین نوترکیب به‌راحتی می‌توان عوامل غیرهدف ایجادکننده سیگنال را از سیگنال مختص به پروتئین نوترکیب هدف، تشخیص داد. با استفاده از این تکنیک، پروتئین CryIA(b) در هر دو حالت، هم با ساختار طبیعی و هم با ساختار واسرشت‌شده (degraded) در مواد غذایی حاوی ذرت تراریخته، توسط آنتی‌بادی پلی‌کلونال تشخیص داده شد (Margarit et al, 2006).

دات بلات (dot blot)

بسیاری از مراحل دات بلات یا دیبا (dot-immunobinding assay; DIBA)، همانند

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

تکنیک وسترن است. در دات بلات، برخلاف وسترن بلات که نمونه‌ها بر روی ژل اکریل آمید از هم جدا می‌شوند، نمونه‌های مورد آزمون، به‌صورت لکه‌های دایره‌ای شکل بر روی کاغذ نیتروسلولزی بارگذاری شده و بقیه مراحل همانند وسترن انجام می‌شود. در این روش با حذف مراحل آماده‌سازی نمونه و عدم ساخت ژل (حذف مراحل بارگذاری، جداسازی و انتقال از ژل به کاغذ نیتروسلولزی)، در زمان صرفه‌جویی شده و موجب کاهش معنی‌دار هزینه‌ها و ساده‌تر شدن اجرای آن می‌شود. بنابراین در اکثر مواقع به‌دلیل سادگی آزمون دات بلات، قبل از انجام وسترن، ابتدا سری رقت‌های آنتی‌بادی برای تشخیص پروتئین نوترکیب، بررسی می‌شوند. چنین مزیتی این امکان را فراهم می‌سازد تا بتوان نمونه‌های بسیاری را به‌طور همزمان، مورد آزمون قرار داد. بنابراین برای غربال سریع با تعداد نمونه‌های زیاد، می‌توان از تکنیک دات بلات به عنوان یک روش ارزان‌تر و جایگزین نسبت به روش‌های دیگر استفاده کرد. در مطالعه‌ای محققین توانستند گیاهان تراریخته برنج را که قادر بودند پروتئین نوترکیب Oak1 را در نسل T_0 تولید کنند، با استفاده از روش دات بلات شناسایی و تایید کنند (Lim and Lai, 2007). البته ایراد این روش در این است که اگر پروتئین‌های هم‌خانواده با پروتئین هدف، در داخل نمونه باشند و یا اپی‌توپ‌های مشابهی به غیر از اپی‌توپ هدف وجود داشته باشد، امکان خطا بالا رفته و به‌دلیل نداشتن اطلاعات تکمیلی از اندازه پروتئین (به‌دلیل حذف مرحله جداسازی پروتئین‌ها از هم)، امکان تصمیم‌گیری قطعی برای تراریخته بودن یا نبودن یک نمونه وجود نخواهد داشت. برای رفع این مشکل می‌توان از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یا نوترکیب اختصاصی‌تر استفاده کرد (Falak et al, 2020).

نوار تشخیص سریع یا LFD (lateral flow device)

در پزشکی استفاده از نوارهای تشخیص برای ردیابی سریع فعل و انفعالات بدن مانند بارداری و یا بیماری‌هایی مانند هپاتیت متداول است (Ryu et al, 2018). دو ویژگی اصلی کیت‌های نواری که شامل سرعت و سهولت استفاده از آنهاست، دلیل معقولی برای استفاده گسترده، در زمینه‌های بسیار متنوع است (Bandla et al, 2011).

روش استفاده از این نوارها ساده بوده و برعکس بقیه روش‌ها، نیاز به دانش تخصصی ندارد و هر فرد می‌تواند به راحتی آن را انجام داده و برحسب مشاهدات، نتیجه‌گیری و تصمیم بگیرد. به‌تازگی از این روشِ کاربردی برای تشخیص سریع

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

موجودات تراریخته، چه در سطح تحقیقات و آزمایشگاه‌های مهندسی ژنتیک و چه در سطح خارج از آزمایشگاه (on-site) استفاده می‌شود (Wang et al, 2020).

از تکنیک ایمونوکروماتوگرافی، در بخش‌های مختلف کشاورزی نیز، برای ردیابی و شناسایی GMOها استفاده می‌شود. نمونه‌گیری از دانه، بلغور و برگ گیاهان تراریخته مانند ذرت، کلزا، برنج، سویا، و یونجه انجام و به کمک نوارهای تشخیص سریع، تراریخته بودن یا نبودن آنها، مشخص می‌شود (Romer Labs Inc., www.romerlabs.com).

شرکت Agdia از شرکت‌های مطرح در تشخیص GMOها، است. تولیدات و کیت‌های تشخیصی این شرکت بر پایه روش‌های ایمونواسی و بخصوص نوارهای تشخیص سریع است. به‌طور مثال نوارهای تشخیص آن، قادر است انواع پروتئین‌های نوترکیب متداول مانند mBt-، Bt-Cry3A، Bt-Cry2A، Bt-Cry1Ab/1Ac، Cry3A، Bt-Cry3Bb1، Bt-Cry34Ab1، Bt-Cry35Ab1، Bt-Cry1F، Bt-Cry9C، PAT/pat، GA21، GT21، CspB، EPSPS، CP4 و Vip3A موجود در گیاهان تراریخته و یا محصولات آنها را تشخیص دهد. برخی از این کیت‌های نواری ایمونواسی، به‌صورت تکی و برخی دیگر به‌صورت شانه‌ای طراحی شده است که قادرند به‌طور همزمان، چندین پروتئین نوترکیب را در یک نمونه واحد تشخیص دهند (www.agdia.com).

با این روش ردیابی پروتئین‌های نوترکیب تراریخته، ساده بوده و معمولا با عصاره‌گیری و یا با له کردن بخشی از بافت و قرار دادن نوار تشخیص در محلول آن، انجام‌پذیر است. این نوارها، بر حسب نوع تشخیص، عمل، اجزا و کاربرد به دو دسته کلی ساندویچی و آزمون‌های رقابتی تقسیم می‌شوند. این دو دسته، در اصول مشابه روش‌های ساندویچی و رقابتی الایزا هستند. در متداول‌ترین حالت آنتی‌بادی‌های اولیه (در خط تست) و ثانویه (در خط کنترل) بر روی یک نوار نیتروسلولزی به‌صورت خطوط عرضی بارگذاری و به‌طور ثابت متصل می‌شوند. با عبور محلول نمونه از روی آنها، در خط تست پروتئین نوترکیب گیر افتاده و همراه خود آنتی‌بادی - نانوذره متصل به خود را، در آن ناحیه، ثابت نگه می‌دارد و منجر به ظهور خط مرئی می‌شود. در خط کنترل نیز، آنتی‌بادی اولیه متصل به نانوذره، توسط آنتی‌بادی ثانویه گیر افتاده و بدین وسیله، صحت آزمون تأیید می‌شود (Bandla et al, 2011).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

روش ترکیبی Immuno-PCR

روش ایمونو - پی‌سی‌آر (immuno PCR: IPCR یا quantitative immuno-PCR: qIPCR)، ترکیبی از قابلیت realtime PCR با تکنیک الایزاست. ترکیب روش‌های مبتنی‌بر PCR و ایمونواسی، تشخیص بهتر و دقت بیشتری را فراهم کرده است. در این روش تکثیر اسیدنوکلئیک با آزمون‌های مبتنی بر آنتی‌بادی همراه است (Chang and Wang, 2016). در مرحله اول آنتی‌بادی اولیه بر روی سطح جامد متصل شده و بعد از شستشو و اضافه کردن نمونه حاوی پروتئین نوترکیب، پروتئین هدف به آنتی بادی اولیه متصل می‌شود. بعد از شستشوی نمونه، آنتی‌بادی دوم به صورت حالت ساندویچی به پروتئین نوترکیب متصل می‌شود. نکته اصلی این است که آنتی‌بادی دوم قبلا به یک سری توالی‌های نوکلئوتیدی مشخص متصل شده است. پس از انجام حالت ساندویچی و شستشوی مواد اضافی، توالی متصل به آنتی‌بادی به روش realtime تکثیر شده و نمودارهای حاصل از آن، به راحتی و به‌طور غیرمستقیم، نشاندهنده میزان پروتئین نوترکیب در نمونه است. با این روش می‌توان انواع پروتئین‌های نوترکیب مانند ژن Cry1Ac موجود در تراریخته‌ها را با دقتی بالاتر از روش‌های دیگر تشخیص داد (Kumar and Sinha, 2014).

روش ایمونو-مغناطیسی (immunomagnetic)

در این روش با استفاده از یک خصوصیت فیزیکی که همان خاصیت مغناطیسی است، می‌توان انواع ماکروملکول‌ها و حتی سلول‌ها را به کمک آنتی‌بادی‌های متصل شده با نانوذرات، از محلول جدا و بررسی کرد. یکی از نقاط برجسته این روش سه بعدی بودن آن است. برخلاف روش‌های قبلی که آزمون به‌صورت دوبعدی (متصل به یک سطح جامد) انجام می‌شد، در این روش آنتی‌بادی به راحتی در هر سه بعد معلق در محلول، قابلیت اتصال به آنتی‌ژن را دارد. با این شرایط، آزادی عمل بیشتری برای آن می‌توان متصور شد (Park et al, 2013).

همین مزیت باعث شده که بتوان پروتئین‌های نوترکیب GMOها را، در یک نمونه محلول، ردگیری و جدا کرد و به عنوان روشی برای غربال نمونه‌های تراریخته از آن استفاده کرد. روش کار ساده و سریع بوده، به‌طوری که پس از انتخاب آنتی‌بادی (های) اختصاصی که اپی‌توپ(های) مشخصی از یک پروتئین نوترکیب را شناسایی و به آن متصل می‌شود، آنتی‌بادی(ها) را با نانوذرات خاصی (magnetic beads) پوشش داده و پس از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

اضافه کردن به محلول نمونه، آنها را در یک میدان مغناطیسی قرار می‌دهند. بدین ترتیب، پروتئین نوترکیب متصل به آنتی‌بادی پوشش داده شده با نانوذرات، تحت کشش میدان مغناطیسی قرار گرفته و به دیواره جذب می‌شود. سپس با روش‌های مختلف می‌توان میزان پروتئین نوترکیب محلول را اندازه‌گیری کرد. به‌طور مثال برای ردیابی و تشخیص پروتئین Cry1Ab در گیاهان تراریخته، از این تکنیک به همراه دو روش شناسایی بر پایه رنگ‌سنجی و کمی‌لومینسنس به کمک دو نوع آنتی‌بادی مونوکلونال و پلی‌کلونال توانستند، به‌صورت تک‌مرحله‌ای پروتئین نوترکیب را در نمونه‌های تراریخته گیاهی شناسایی کنند (Gao, 2019). انعطاف این روش با ترکیب نانوذرات با کوآنتوم دات‌ها (quantum dots) این قابلیت را می‌دهد که بتوان در یک نمونه با صرف کم‌ترین زمان، چندین پروتئین نوترکیب هدف را شناسایی و ردیابی کرد (Park et al, 2013).

نتیجه‌گیری

همانطوری‌که مشخص است روش‌های متعددی برای غربال و شناسایی موجودات تراریخته از سطح تحقیقات تا سطح تولید، عرضه و بازار محصولات تراریخته وجود دارد که می‌توانند مبتنی بر روش‌های تشخیص ایمونواسی باشند. توجه به این نکته نیز قابل تامل است که در رابطه با مطالعه GMOها، در خیلی از موارد، هدف صرفا ردیابی و تشخیص پروتئین‌های نوترکیب نیست و در اکثر موارد، الزام برای مطالعه تاثیرات احتمالی آنها، بر روی پروتئین‌های دیگر و یا مسیر متابولیکی خاصی، مد نظر است. تحت چنین شرایطی، بهترین ابزار تحقیق، استفاده از روش‌های مبتنی بر ایمونواسی است. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای بر روی دو گروه گیاه تراریخته و غیرتراریخته سویا، برای اینکه ببینند آیا بین دو گروه اختلافی از لحاظ تغییر الگوی بیان و اثرگذاری هشت دسته اصلی پروتئین‌های آلرژی‌زا، وجود دارد یا نه، از روش‌های الایزا، وسترن بلات و نوار تشخیص سریع توأمان استفاده شد. در نهایت مشخص شد که از لحاظ آلرژی‌زایی بین دو گروه گیاه تراریخته و غیرتراریخته تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (Matsuo et al, 2020). به عنوان نتیجه گیری کلی، توصیه می‌شود برای کسب اطلاعات بیشتر و ارزیابی جامع GMOها، در صورت امکان، از انواع مختلف هر دو روش مبتنی بر دی.ان.اِ و ایمونواسی، با هم استفاده شود. زیرا که هر یک از آنها می‌تواند مکمل دیگری بوده و علاوه بر تأیید یکدیگر، اطلاعات بسیار ارزشمندی را در اختیار ما قرار دهد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

References فهرست منابع

Ahmed S, Jianan N, Dapeng P, Ting Ch, Ijaz A, Aashaq A, Zhixin L, Muhammad A.Sh, Guyue Ch, Zonghui Y. 2020. Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review. Food and Agricultural Immunology. 31(1): 268-290.

Bandla M, Thompson R, Shan G. 2011. Lateral flow devices. Immunoassays in Agricultural Biotechnology. 91-114.

Chang L, Li J, Wang L. 2016. Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. Analytica Chimica Acta. 910: 12-24.

Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. 2017. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?. Autoimmunity Highlights. 8(1): 1-8.

Cui M, Lin H, Wang X, Cao L, Sui J. 2015. 5-Sulfosalicylic acid dihydrate-based pretreatment for the modification of enzyme-linked immunoassay of fluoroquinolones in fishery products. Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 36(5), 517-531.

Ducrotoy MJ, Muñoz PM, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I. 2018. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. Preventive Veterinary Medicine. 151, 57-72.

Falak R, Ghanjalikhani Hakemi M, Jafari R, Karimi L, Motadayen H, Mansouri M, Yazdani R, Yosefi Z, Asiabanha M, Fazeli B. 2020. Immunochemistry, A basic and practical laboratory guidebook, Iran University of medical sciences, Immunology Reasearch Center. p. 240.

Forutan H, Khodabakhsh M, Jouharideha F, Pourabdi L. 2016. Comparative study of different radioiodination methods of monoclonal antibody for immunoradiometric assay of prostate specific antigen. Journal of Nuclear Science and Technology. 36 (72): 46-53.

Ganjilikhani Hakemi M, Ziaee Ghahnaviveh M. 2018. Experimental methods in immunology. Jame e-Negar Publishing House. p. 224.

Gao H, Wen L, Hua W, Tian J, Lin Y. 2019. Highly sensitive immunosensing platform for one-step detection of genetically modified crops. Scientific Reports. 9(1): 1-8.

Gao Y, Huang X, Zhu Y, Lv Z. 2018. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 39(4): 351-364.

Kamle S, Li D, Ojha A, Kumar A. 2019. Development of an Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of GM proteins in transgenic crops/produce. In Transgenic Cotton. 159-166

Kaufmann SH. 2017. Emil von Behring: translational medicine at the dawn of immunology. Nature Reviews Immunology. 17(6), 341-343.

Kaufmann SH. 2019. Immunology's coming of age. Frontiers in Immunology. 3(10): 684.

Khomenko YV, Ishchenko LM, Ishchenko VD, Midyk SV, Rybalchenko DY, Ushkalov VO, Spyrydonov VG. 2019. Development of ELISA Kit for detection of glyphosate-resistant genetically modified soybean. Methods and Objects of Chemical Analysis. 14(1), 21-29.

Kumar R, Sinha RP. 2014. Real-time immuno-PCR: An approach for detection of trace amounts of transgenic proteins. Journal of AOAC International. 97(6): 1634-1637.

Li YF, Sun YM, Beier RC, Lei HT, Gee S, Hammock BD, Xu ZL. 2017. Immunochemical techniques for multianalyte analysis of chemical residues in food and the environment: A review. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 88: 25-40.

Lim YY, Lai KS. 2017. Generation of transgenic rice expressing cyclotide precursor Oldenlandia affinis kalata B1 protein. J Anim Plant Sci. 27(2), 667-671.

Liu A, Anfossi L, Shen L, Li C, Wang X. 2018. Non-competitive immunoassay for low-molecular-weight contaminant detection in food, feed and agricultural products: A mini-review. Trends in Food Science and Technology. 71: 181-187 .

Liu W, Liu X, Liu C, Zhang Z, Jin W. 2020. Development of a sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA to detect Vip3Aa in genetically modified crops. Biotechnology letters. 42(8): 1467-1478.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

Liu Z, Gao L, Wang X, Sun J, Yang Z, Chai T. 2013. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA to detect PAT protein in genetically modified maize. Journal of Northwest A and F University-Natural Science Edition. 41(11): 45-50.

Malik K, Sadia H, Basit MH. 2018. Protein-Based detection methods for genetically modified crops. in protein-protein interaction assays. IntechOpen. p. 47-66.

Margarit E, Reggiardo MI, Vallejos RH, Permingeat HR. 2006. Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. Food Research International. 39(2): 250-255.

Matsuo A, Matsushita K, Fukuzumi A, Tokumasu N, Yano E, Zaima N, Moriyama T. 2020. Comparison of various soybean allergen levels in genetically and non-genetically modified soybeans. Foods. 9(4): 522.

Mir MA, Mehraj U, Qayoom H, Nisar S. 2020. Radioimmunoassay (RIA). immunoglobulins, magic bullets and therapeutic antibodies. p. 241.

Park H, Hwang MP, Lee K.H. 2013. Immunomagnetic nanoparticle-based assays for detection of biomarkers. International Journal of Nanomedicine. 8: 4543.

Paul M, Weller MG. 2020. Antibody screening by microarray technology—direct identification of selective high-affinity clones. Antibodies. 9(1): 1-16.

Peterson VM, Kelvin XZh, Namit K, Jerelyn W, Lixia L, Douglas CW, Renee M, Terrill K.M, Svetlana S, Joel A.K. 2017. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. Nature Biotechnology. 35(10): 936-939.

Rahbarizadeh F, Asadi Karam Gh, Rahimi Jamnani F. 2019. Polyclonal and monoclonal antibodies (from production to application), Tarbiat Modares University Press. 199: 254.

Ramos-Martinez EM, Fimognari L, Sakuragi Y. 2017. High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga Chlamydomonas reinhardtii. Plant biotechnology journal. 15(9): 1214-1224.

Rüker F. 2021. Monoclonal Antibodies and Hybridomas. In Introduction to Antibody Engineering. p. 41-63.

Ryu J.H, Kwon M, Moon JD, Wang HMW, Lee JM, Park K.H, Yun SJ, Bae HJ, Choi A, Lee H, Oh EJ. 2018. Development of a rapid automated fluorescent lateral flow immunoassay to detect hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibody to HBsAg, and antibody to hepatitis C. Annals of Laboratory Medicine. 38(6): 578.

Salihah NT, Hossain MM, Lubis H, Ahmed MU. 2016. Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. Journal of Food Science and Technology. 53(5): 2196-2209.

Signore M, Manganelli V, Hodge A. 2017. Antibody validation by western blotting. In Molecular Profiling. p. 51-70.

Thangadurai D, Shettar AK, Sangeetha J, Raju CS, Islam S, Al-Tawaha ARMS, Jasmin H, Shabir AW, Baqual MF. 2020. Transformation techniques and molecular analysis of transgenic rice. In Rice Research for Quality Improvement: Genomics and Genetic Engineering. p. 221-245.

Thomas LW, Lee EB, Wu JJ. 2019. Systematic review of anti-drug antibodies of IL-17 inhibitors for psoriasis. Journal of Dermatological Treatment. 30(2): 110-116.

Wang X, Chen Y, Chen X, Peng C, Wang L, Xu X, Wu J, Wei W, Xu J. 2020. A highly integrated system with rapid DNA extraction, recombinase polymerase amplification, and lateral flow biosensor for on-site detection of genetically modified crops. Analytica Chimica Acta. 1109: 158-168.

Zhou H, Junlai L, Changyang Z, Ni G, Zhiping R, He L, Xinde H, Li C, Yao X, Shen X, Sun Y, Wei Y, Liu F, Ying W, Zhang J, Tang C, Zhang X, Xu H, Shi L, Cheng L, Huang P, Yang H. 2018. In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR–dCas9-activator transgenic mice. Nature Neuroscience. 21(3): 440-446.

Zhou Q, Li G, Zhang Y, Zhu M, Wan Y, Shen Y. 2016. Highly selective and sensitive electrochemical immunoassay of Cry1C using Nanobody and π–π stacked Graphene oxide/Thionine assembly. Analytical Chemistry. 88(19): 9830-9836.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]

Immunoassay-Based Methods for Detection of Genetically Modified Organisms

Saeed Soheilivand

Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

soheilivand@abrii.ac.ir

Abstract

The production of genetically modified organisms (GMOs) refers to crops, animals and microorganisms that emerged over the past three decades. GMOs triggered the opportunities to meaningfully increase the quantity and quality of production in agriculture, enhance nutritional quality, management of pests, weed and disease sustainability, reduce costs for food or drug production, improve public health as well as enhancing the quality of life. In following, systematic genetic dissection of modified organisms causes to dramatically expand the genomic knowledge and understanding. Based on the prevalence the transgenic organisms many countries or companies may need to execute GMO tests on diagnosing transgenic organisms and their products. The detection and labeling of transgenics crops aids researchers, farmers, suppliers, consumers, and GMO reference laboratories distinguish and track the genetic identity of GMOs at every stage of research, production, and transportation. The aim of the present review is to overview the antibody-based immunoassay methods for the detection of GMOs and their recombinant proteins.

Keywords: Antibody, Epitope, Recombinant Protein, Labeling.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.6.2]