پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
3-5 آذر ماه 1386، سالن اجلاس سران
The 5th National Biotechnology Congress of Iran
24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

جستجوی مولکولی (Molecular Detection) محصولات دست ورزی شده ژنتیکی (GM) در دان طیور صنعتی به روش PCR

دکتر ابراهیمیان محبوبه*، دکتر باسامی محمدرضا**،دکترجمشیدی عبدالله، ماهوتی خورده چشمه امیر
دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده فارسی

دامنه حضور فناوری زیستی در زندگی روزمره جوامع انسانی در حال گسترش روز افزون می باشد. با توجه به طبیعت این فناوری تاثیر بلامنازع آن در اقتصاد، محیط زیست، بهداشت و سلامت انسان بدون تردید یک نقش مثبت خواهد بود. با این وجود همانند هر فناوری نوین، این فناوری می تواند به صورت بالقوه برای حیات انسان و محیط زیست خطر آفرین باشد. زیرا دستکاری در ژنوم موجودات می تواند به تغییراتی منتج شود که با ساختار حیات متناقض باشد. البته این موضوع می تواند در حد یک احتمال باقی مانده یا به وضعیتی منجر شود که دامنه این قبیل دخالت ها را محدود تر نماید. بحث و جدل موجود در جوامع توسعه یافته بر سر استفاده یا ممنوعیت استفاده از محصولات GM به صورت روز افزونی در حال گسترش می باشد. جریان حاضر در کشورهای توسعه یافته در مورد این پدیده منجر به برچسب گذاری اجباری محصولات GM شده است. در ایران ظاهرا محصولات GM نیز برای ورود به کشور بایستی به تصویب رسیده و با مجوز وارد شوند. بررسی فوق یک اقدام اولیه جهت ارزیابی مصرف محصولات GM در کشور می باشد. با استفاده از پرایمرهای 35 S از چند نمونه دان مصرفی طیور صنعتی برای شناسایی مولکولی محصولات GM به روش PCR استفاده گردید. در تست انجام شده بر روی چند نمونه دان باند مورد انتظار با اندازه 194 جفت باز مشاهده گردید. ضروری است هویت این آمپلیکون از طریق توالی یابی دقیقا مشخص گردد.

کلمات کلیدی: GM Foods

مقدمه

دامنه حضور فناوری زیستی در زندگی روزمره جوامع انسانی در حال گسترش روز افزون می باشد. با توجه به طبیعت این فناوری تاثیر بلامنازع آن در اقتصاد، محیط زیست، بهداشت و سلامت انسان بدون تردید یک نقش مثبت خواهد بود. گونه های جدید گیاهی، جانوری و میکروبی بهره وری بیشتر وبهتر ازمنابع طبیعی را میسر ساخته است. سویا،ذرت،کتان ،کانولا و سیب زمینی بیشترین محصولات GM (82%) از کل محصولات GM در سال 2000 را شامل می شود) هستند. تشخیص مناسب غذاهای دست کاری شده ژنتیکی (GM) توسط روش های مولکولی و ایمونولوژیک میسر می باشد. در این رابطه بسته به پروموتور مورد استفاده در تکوین آن گیاه دستکاری شده از

پرایمرهای مخصوص آن پروموتور بدین منظور استفاده میشود. در این ارتباط عمدتا از چهار جفت پرایمر 35s، EPSPS، LET و NOS، که قادر به شناسایی و هیبریداسیون با توالی های مکمل خود که در قالب پروموتور در ساختار ژنتیکی گیاه دستکاری شده ادغام شده اند، می باشند در تشخیص مولکولی غذاهای GM مورد استفاده واقع می شوند.

مواد وروش کار:

در این بررسی به منظور استخراج DNA از کیت مخصوص استخراج DNA از محصولات دست ورزی شده ژنتیکی گیاهی محصول شرکت Bioneer کره جنوبی استفاده گردید. مراحل استخراج DNA بدین صورت بود که 20-40mg دان آماده طیور با استفاده از ازت مایع به خوبی پودر شد، و بر اساس دستورالعمل کیت رفتار شد. سپس PCR با استفاده از پرایمر 35S انجام شد. آزمایش PCR درحجم 25 مایکرولیتر مشتمل بر مواد ذیل صورت گرفت: 2 مایکرولیتر از DNA الگو، 2/5 مایکرولیتر بافر PCR (10x)، 0/5 مایکرولیتر dNTPs (mM10)، یک مایکرولیتر کلرور منیزیوم (50mM)، پرایمر رفت و برگشت هر یک به میزان یک مایکرولیتر (ده پیکومول) و آنزیم Taq پلیمراز به میزان یک واحد بین المللی. نهایتا 5µl از امپلیکون در ژل آگاروز 2% با ولتاژ 90 ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با غلظت 0/5 میکرو گرم درمیلي لیتر به روش post-staining، نتایج تحت اشعه UV ملاحظه و توسط دستگاه مستند سازی ژل (Gel Documentation Apparatus) ثبت گردید. توالی هدف، توالی نوکلئوتیدها، اندازه محصول و برنامه ترموسایکلر در جدول 1 آمده است.

جدول1: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده، اندازه محصول و شرایط ترموسایکلر

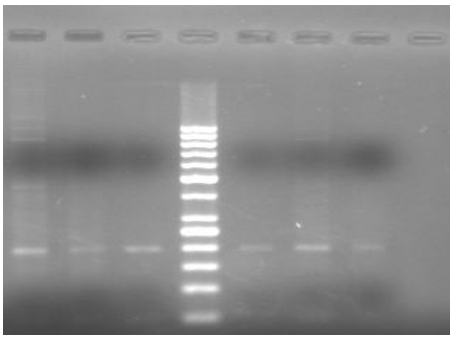
توالی هدف	توالی نوکلئوتیدها	اندازه (bp)	برنامه ترموسایکلر
35S promoter	F: 5′-GCTCCTACA AATGCCATC A-3' R: 5' GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	194	94ºCfor 5min 94ºC for 60s, 51ºC for 30s, 72ºCfor 60s for 35 cycles 72 ºC for10 min

نتایج و بحث

آنالیز نتایج PCR حضور باند مورد انتظار با اندازه 194 جفت باز را تایید نمود. در این مطالعه بر اساس منابع منتشره پرایمرهای 35S که اختصاصی پروموتوری به همین نام (35 s promoter) می باشند، جهت انجام آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفتند. این پروموتور از جمله پروموتورهایی است که به فراوانی در تکوین محصولات GM به کار گرفته شده اند. در یک بررسی در سال 1997 مشخص گردید که تعداد 22 محصول GM از 28 محصول واجد این ژن می باشند. اگر چه مصرف یا عدم مصرف غذاهای دست ورزی شده ژنتیکی در دنیا از مخالفان و موافقان متعددی برخوردار می باشند، ولی با توجه به روند توسعه این فناوری می توان پیش بینی نمود که دامنه تکوین و توسعه این محصولات و راه یابی آنها به اکوسیستم اجتناب ناپذیر است. کشور ایران نیز نمی تواند از این پروسه جدا باشد. آن چه که مورد انتظار می باشد این است که تمامی فعالیت های انجام شده یا در دست انجام باید کاملا شفاف و روشن باشند. متولیان بهداشت انسان و دام نیز در این راستا واجد

سیاست های تدوین شده بوده و از ورود یا مصرف این قبیل محصولات آگاهی کافی را داشت باشند و سیاست مدونی را در رابطه با صدور مجوز چه برای تولید و چه برای واردات اتخاذ نمایند. در صورت تایید مصرف هر یک از این مواد می بایست مصرف کننده با مطالعه برچسب محصول بداند که محصول مورد خریداری GM می باشد. به عنوان مثال در کشور سوئیس غذاهایی که بیشتر از 1% حاوی محصولات GM می باشند قانونا بایستی واجد برچسب باشند. پژوهش حاضر اولین تلاش برای جستجوی مولکولی محصولات GM توسط نگارندگان می باشد. در این رابطه از نمونه دان های مصرفی مرغداری های صنعتی علی رغم عدم دسترسی به نمونه کنترل مثبت در یک بررسی اولیه باند مورد انتظار در تمام نمونه های تست شده مورد ملاحظه قرار گرفت. شایان ذکر است که با توجه به محدودیت های زمانی امکان تعیین هویت امپلیکون تکثیر شده به روش تعیین توالی فراهم نگرید. بدیهی است علاوه بر قطعیت تشخیص بایستی نمونه های دان، سویا و ذرت بیشتری از مرغداری ها جمع آوری و مورد آزمایش قرار گیرند تا دامنه واردات این محصولات که احتمالا سویا و دان های وارداتی میباشند، مشخص گردد. با توجه به استفاده از دیگر پروموتور ها از جمله EPSPS، LET و NOS سیمای دقیقی از میزان ورود محصولات GM در چرخه غذایی دام و انسان مشخص شود. این بررسی صرفا گزارش یک بررسی مقدماتی در خصوص حضور محصولات GM در کشور می باشد. تایید این نتیجه آغازین بایستی توسط توالی یابی محرز گردد.

1 2 3 4 5 6 7 8



شکل1: نتیجه آزمایشPCR . باند مورد انتظار با اندازه 194 bp در تمامی نمونه ها به استثنای نمونه کنترل منفی مشاهده می شود. چاهک شماره 1،2،3،5،6،7 مربوط به نمونه های مثبت ، چاهک شماره 8 مربوط به نمونه کنترل منفی و چاهک شماره 4 نیز مربوط به مارکر 50bp می باشند.

منابع

1. HSU-YANG LIN*, JIN-WEN CHIANG AND DANIEL YANG-CHIH SHIH(2001) Detection of Genetically Modified Soybeansby PCR Method and Immunoassay Kits. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 9, No. 3, Pages 160-166
2. Diana L. Brandner(2002) PCR-Based Detection of GeneticallyModified Foods/Madison Area Technical College
3. Alejandro C. Tozzini*M. Carolina Martínez/M. Florencia Lucca/Cecilia Vázquez Rovere/Ana Julia Distéfano/Mariana del Vas/H. Esteban Hopp/2000/Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification/Electron. J. Biotechnol. v.3 n.2 Valparaíso

جـــدول

1: مشخصـــات

پـنـجـمـيـن هـمـايـش مـلـي بـيـوتـكـنـولـوژي جـمـهـوري اسـلامـي ايـران

3-5 آذر مـاه 1386، سـالـن اجـلاس سـران

The 5th National Biotechnology Congress of Iran

24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

Molecular Detection of Genetically Modified Poultry Diets by PCR

Abstract

Transfer and accumulation of novel DNA and/or proteins in food for human consumption derived from animals receiving genetically modified (GM) feed could be a potential risk. Thefore the use of GM foods should be regulated by the authorities. In the present study, the presence of GM foods was examined in a few poultry diets. The 35 S primers employed in this assay were selected based on published articles. In all samples, except negative control, the expected PCR product with the size of 194 bp was observed. The result has to be confirmed by nucleotide sequence analysis.