روش‌های ردیابی محصولات تراریخته

(چاپ دوم)

نگارندگان

دکتر فاطمه رهبری‌زاده

دکتری بیوشیمی بالینی - عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی پزشکی – دانشگاه تربیت مدرس

ترکان رضائی چیانه

کارشناس ارشد صنایع غذایی – دانشگاه تربیت مدرس

دکتر بهمن حسینی

دکتری بیوتکنولوژی گیاهی - عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

دکتر فاطمه رحیمی جمنانی

دکتری بیوتکنولوژی دارویی - عضو هیأت علمی انسیتو پاستور ایران

1398

عنوان و نام پدیدآور: روش‌های ردیابی محصولات تراریخته/نگارندگان فاطمه رهبری‌زاده...[و دیگران]؛
ویراستار ادبی و فنی: لیلا نجفی‌زمان.
مشخصات نشر: تهران: انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، 1397
مشخصات ظاهری: 328ص.
شابک: 978-600-7589-62-5
وضعیت فهرست نویسی: فیپا
یادداشت: نگارندگان فاطمه رهبری‌زاده، ترکان رضایی‌چیانه، بهمن حسینی، فاطمه رحیمی‌جمنانی.
موضوع: گیاهان تراریخته
موضوع: Transgenic plants
شناسه افزوده: رهبری‌زاده، فاطمه، 1349 -
شناسه افزوده: انتشارات دانشگاه تربیت مدرس.
شناسه افزوده: Tarbiat Modares University. TMU Press
رده‌بندی کنگره: 1397 9ر/SB123/57
رده‌بندی دیویی: 631/5233
شماره کتابشناسی ملی: 5270319

روش‌های ردیابی محصولات تراریخته

نگارندگان: دکتر فاطمه رهبری‌زاده، ترکان رضایی چیانه، دکتر بهمن حسینی، دکتر فاطمه رحیمی جمنانی
ویراستار ادبی و فنی: لیلا نجفی زمان
طراح جلد: ترنج
صفحه‌آرایی: فرشته نجفی
شماره انتشار: 231
شماره پیاپی: 386
تاریخ انتشار: 1398
شمارگان: 500
شابک چاپی: 978-600 – 7589 – 62 – 5 **شابک الکترونیکی:** 978-622-8376-51-6
ناشر: انتشارات دانشگاه تربیت مدرّس
نوبت چاپ: دوم
کارشناس اجرایی: فاطمه طالبی
ناظر چاپ: مصطفی جانجانی
لیتوگرافی، چاپ و صحافی: قشقایی
مرکز پخش: تقاطع بزرگراه‌های آل‌احمد و دکتر چمران،
انتشارات دانشگاه تربیت مدرّس، صندوق پستی: 318-14115
تلفن: 82883096 دورنگار: 82883032
آدرس اینترنتی فروش: pub.modares.ac.ir

صحت مطالب کتاب بر عهده نگارندگان است.

تمام حقوق این اثر برای مرکز نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس محفوظ است و تکثیر کتاب به هر روشی بدون اجازه کتبی ناشر پیگرد قانونی دارد.

حمد و سپاس خدایی را، که آفرید جهان را، انسان را،

عقل را، علم را، معرفت را، عشق را.

و تقدیم به کسانی که عشقشان را در وجودمان دمید.

فهرست مطالب

پیشگفتار ..... ک

بخش اول - مباحث نظری

1- چشم‌انداز و مقدمه‌ای بر گیاهان تراریخته (GMO) 3

مقدمه 3

دست‌ورزی ژنتیکی در گیاهان 4

سطح زیر کشت محصولات زراعی تراریخته 6

لزوم تشخیص مواد تراریخته 10

استانداردها و مقررات جهانی در زمینه ایمنی زیستی 11

ویژگی‌های موجودات تراریخته 13

انواع ژن‌های انتقالی طی تراریختی 14

منابع 16

2- چگونگی شناسایی گیاهان زنده تراریخته 19

مقدمه 19

الف) تجزیه‌های فنوتیپی 20

- روش‌های مبتنی بر آزمون زیستی 21

- روش‌های ایمنولوژی 21

- روش الایزا 22

- نوارهای جریانی جانبی 22

ب) تجزیه‌های ژنوتیپی 23

مراحل شناسایی موجودات تراریخته 24

الف) مرحله نمونه‌برداری 26
ب) مرحله آماده‌سازی نمونه 28
ج) مرحله غربال برای موجودات تراریخته 29
د) مراحل تشخیص موجودات تراریخته 30
و) مرحله تشخیص کمّی میزان محصولات تراریخته 32
منابع 32
3- استخراج و خالص‌سازی DNA 35
مقدمه 35
روش‌های استخراج 38
روش‌های خالص‌سازی 38
استخراج / رسوب‌دهی 39
کروماتوگرافی 39
سانتریفوژ 40
جداسازی براساس میل ترکیبی 41
روش استخراج و خالص‌سازی باCTAB 41
اصول روش CTAB: لیز کردن، استخراج و رسوب‌دهی 42
لیز کردن غشای سلولی 42
استخراج 45
رسوب‌دهی 45
استخراج DNA از روغن‌های گیاهی 46
کمّی‌سنجی DNA استخراج شده 47
سنجش غلظت DNA به‌وسیله اسپکتروفتومتری 47
اصول اسپکتروفتومتریک تعیین غلظت DNA 48
نکات مهم در تعیین غلظت اسیدهای نوکلئیک 50
تعیین غلظت نمونه‌ای نامشخص 50
منابع 51
4- ژل الکتروفورز 53
مقدمه 53

محیط‌های الکتروفورز 54
آگارز 55
اصول فیزیکی الکتروفورز در ژل آگارز 55
بافر الکتروفورز 59
غلظت آگارز 60
DNA نشانگر 60
بافر بارگذاری 60
پلی‌اکریل‌آمید 61
منابع 63
5- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 65
مقدمه 65
انواع روش‌های PCR 66
اجزا، ساختار و همانندسازی DNA 67
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) 72
اصول PCR 74
واسرشت‌سازی الگو 77
اتصال آغازگر 77
گسترش آغازگر 78
ابزار و ترکیبات برای PCR 78
DNA هدف 79
آغازگر 80
DNA پلیمراز 81
آنزیم DNA Taq پلیمراز 81
DNA پلیمراز AmpliTaq® 82
DNA پلیمرازهای: Vent™ و DeepVent™ و Pfu و UITma™ 83
DNA پلیمراز AmpliTaqGold™ 83
بافرهای واکنش و MgCl2 در PCR 83

یون‌های Mg^{2+} 84
نوکلئوتیدها (دزوکسی ریبو نوکلئوزید تری‌فسفات) 85
تعداد چرخه و اثر plateaue (حداکثر عملکرد) 85
طراحی آغازگرها برای PCR 86
طول آغازگر 87
درجه حرارت ذوب (Tm) 87
توالی‌های آغازگر مکمل 89
محتوای G/C وتوالی‌های پلی پیریمیدین (T,C) و پلی پورین (A,G) 89
توالی انتهای ′3 90
بعضی از انواع روش‌های PCR 90
روش‌های پیشگیری از آلودگی 93
جابه‌جایی نمونه‌ها 95
DNase I، اگزونوکلئاز III 97
آماده‌سازی مخلوط اصلی برای واکنش PCR 97
کنترل‌ها 99
کنترل‌های مثبت 100
کنترل‌های منفی 100
منابع 101
6- PCR کمّی برای شناسایی موجودات تراریخته 103
مقدمه 103
روش‌های PCR برای کمّیت سنجی 105
مروری بر تاریخچه real time PCR 110
اصول real time PCR 110
real time PCR با سایبر گرین 111
انواع کاوشگرهای استفاده شده در real time PCR 111
اصول کمّی‌سنجی با real time PCR 119
کمّی‌سنجی نسبی 119
طراحی آزمایش کمّی‌سنجی GMO یا real time PCR 121

واکنش‌های real time PCR چندگانه 122
محاسبه محتوای GMO 126
منابع 128
7- روش‌های ایمنولوژی 131
مقدمه 131
میزان بیان محصولات تراریخت در گیاهان گزارش شده 131
تعاملات آنتی‌بادی – آنتی‌ژن 132
چگونه می‌توان آنتی‌بادی مونوکلونال تولید کرد 135
تولید آنتی‌بادی مونوکلونال 137
تولید آنتی‌بادی با روش‌های موش تراریخته و نمایش فاژی 137
فناوری نمایش فاژی 140
فناوری موش تراریخته 142
آنتی‌بادی و روش الایزا (ELISA) 144
الایزای مستقیم 145
الایزای غیرمستقیم 148
الایزای ساندویچی 150
الایزای ساندویچی مستقیم 150
الایزای ساندویچی غیرمستقیم 152
سنجش‌های رقابتی/مهاری 154
الایزای رقابتی مستقیم (آزمایش برای آنتی‌ژن) 155
الایزای رقابتی مستقیم (آزمایش برای آنتی‌بادی) 156
الایزای مهاری مستقیم (آزمایش برای آنتی‌ژن) 158
الایزای مهاری مستقیم (آزمایش برای آنتی‌بادی) 158
سنجش‌های رقابتی و مهاری برای الایزای غیرمستقیم 159
الایزای رقابتی غیرمستقیم (اندازه‌گیری آنتی‌ژن) 159
الایزای رقابتی غیرمستقیم (اندازه‌گیری آنتی‌بادی) 160
الایزای مهاری غیرمستقیم (اندازه‌گیری آنتی‌ژن) 161

الایزای مهاری غیرمستقیم (اندازه‌گیری آنتی‌بادی) 161
اساس روش شناسایی سویای Roundup Ready 163
منابع 165
بخش دوم - آزمون‌های عملی
8- آزمایش‌های استخراج DNA 171
1- روش فنل/ کلروفرم 171
2- روش فنل/ کلروفرم: روشی برای کشت اولیه سوسیس‌های تخمیر شده 176
3- روش فنل / کلروفرم: روشی برای کشت اولیه ماست 181
4- روش فنل/ کلروفرم: روشی برای استخراج DNA از مخمرها و یا قارچ‌های جدا شده از مواد غذایی 186
5- تهیه DNA با کیفیت مناسب برای PCR با استفاده از روش استخراج DNA براساس پلی وینیل پیرولیدون (PVP) 191
6- تهیه DNA با کیفیت مناسب برای PCR با استفاده از روش‌های استخراج براساس CTAB 194
7- تهیه DNA با کیفیت مناسب برای PCR با استفاده از روش‌های استخراج DNA براساس سیلیکا 199
8- آماده‌سازی DNA با کیفیت مناسب برای PCR با روش استخراج DNA براساس کلروفرم-گوانیدیوم 203
منابع 207
9- آزمایش‌های الکتروفورز 209
DNA نشانگر 210
ژل آگارز الکتروفورز 210
بافر بارگذاری شده (10میلی‌لیتر) 210
آماده‌سازی نمونه‌های DNA ژنومی 211
آماده‌سازی نمونه‌های حاصل از PCR 212
سیستم بافری پیوسته و ناپیوسته 212
پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز (PAGE) در سیستم بافری ناپیوسته 213
PAGE در سیستم بافری پیوسته 216
منابع 217

10- آزمایش‌های PCR معمولی 219
مقدمه 219
بافر PCR 10X 220
محلول $MgCl_2$ 221
25mM 221
محلول آغازگر 20 µM 221
تقسیم بندی آب بدون نوکلئاز در داخل ویال‌ها 222
PCR شناسایی گیاه سویا و ذرت 222
مشخصات آغازگرهای GMO3 و GMO4 222
مشخصات آغازگرهای زئین 3 و زئین 4 223
کنترل‌ها 223
آماده‌سازی مخلوط واکنش PCR 224
تجزیه محصولات PCR 226
تفسیر نتایج 226
استفاده از روش غربالگری برای تشخیص گیاهان تراریخته 227
شناسایی پروموتور 35S 227
شناسایی ترمیناتور nos 228
کنترل‌ها برای شناسایی پروموتور 35S 228
کنترل‌ها برای شناسایی ترمیناتور nos 229
آماده‌سازی مخلوط اصلی برای پروموتور 35S و ترمیناتور nos 229
تجزیه محصولات PCR 231
تفسیر نتایج 231
شناسایی مشخصه ذرت MON810، ذرت Bt-176 و سویای Roudup Readyبا nested PCR .. 232
شناسایی ذرت MON810 232
مشخصات آغازگرهای آغازگر mg1، mg2، mg3 و mg4 233
آماده‌سازی مخلوط اصلی 1 234
آماده‌سازی مخلوط اصلی 2 235

تجزیه محصولات PCR 237
تفسیر نتایج 237
شناسایی ذرت Bt-176 238
مشخصات آغازگرهای CRYIA1، CRYIA2 ، CRYIA3 و CRYIA4 238
تجزیه محصولات PCR 242
تفسیر نتایج 242
شناسایی سویای رانداپ ردی 242
مشخصات آغازگرهای GMO5، GMO9، GMO7 و GMO8 243
آماده‌سازی مخلوط اصلی حاوی آغازگرهای GMO9/GMO5 (برای 10 نمونه) 244
آماده‌سازی مخلوط اصلی حاوی آغازگرهای (GMO7/GMO8) برای 10 نمونه 245
تجزیه محصولات PCR 246
تفسیر نتایج 246
منابع 247
11- آزمون‌های real time PCR 249
مقدمه 249
real time PCR با استفاده از دستگاه ABIPRISM 7700 249
مشخصات آغازگرها و کاوشگرها برای ژن مرجع 251
مشخصات آغازگرها و کاوشگرها برای موجودات تراریخته 252
آماده‌سازی مخلوط اصلی 252
تجزیه و تحلیل داده‌ها و تفسیر نتایج 255
real time PCR با استفاده از LightCycler (Roche) 255
مشخصات آغازگرها و کاوشگرها برای ژن مرجع 257
مشخصات آغازگرها و کاوشگرها برای موجودات تراریخته 257
منحنی‌های استاندارد 257
آماده‌سازی مخلوط اصلی 258
تجزیه و تحلیل داده‌ها و تفسیر نتایج 262
منابع 263

12- آزمایش‌های الایزا 265
مقدمه 265
شناسه‌های ارائه شده با کیت آزمون 267
محدودیت روش 267
کارهای لازم برای اجتناب از آلودگی در طول آماده‌سازی نمونه 268
آماده‌سازی نمونه 269
روش سنجش 270
تهیه آنتی‌بادی‌های ثانویه 270
تهیه بافر شستشو 270
استخراج نمونه‌ها و استانداردهای مرجع 271
رقیق‌سازی نمونه‌های استخراجی 272
روش الایزا 272
افزودن نمونه 273
انکوباسیون نمونه 273
افزودن آنتی‌بادی ثانویه 274
انکوباسیون 274
افزودن سوبسترا 274
افزودن محلول متوقف‌کننده 275
خواندن جذب 275
ارزیابی 275
معیارهای قبول / رد اجرا 275
منابع 277
پیوست 279
واژه نامه فارسی به انگلیسی 297
واژه‌نامه انگلیسی به فارسی 301
نمایه 305

پیشگفتار

موجودات اصلاح شده ژنتیکی (GMO_s)، موجودات زنده‌ای هستند که ساختار ژنتیکی آنها با استفاده از فناوری مهندسی ژنتیکی تغییر کرده است. این موجودات می‌توانند یک گیاه، یک حیوان و یا یک ارگانیسم باشند که در این حال به آنها *تراریخته* می‌گویند. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های مهندسی ژنتیکی در ایجاد موجودات تراریخته باعث ورود گسترده محصولات این فناوری به بازار مصرف شده است. علی‌رغم فواید فراوان محصولات تراریخته (ازجمله افزایش بازدهی تولید) در بین محققان و نیز مردم نگرانی‌هایی درخصوص مصرف این محصولات وجود دارد. در این راستا، برخی از این محصولات برای ورود به بازار مصرف مجوز دریافت کرده و برخی نیز در جریان دریافت مجوز هستند. بنابراین مسئلهٔ مهم در این زمینه، تفکیک محصولات تراریخته از محصولات معمولی است.

در این کتاب سعی بر معرفی روش‌های مختلف شناسایی و ردیابی محصولات تراریخته است تا شاید راهنمای دانشجویان و محققان و اساتید گرانقدر و دست‌اندکاران امر کنترل کیفیت محصولات وارداتی به کشور باشد. کتاب حاضر شامل دو بخش مباحث نظری و آزمون‌های عملی می‌باشد. بخش مباحث نظری شامل مقدمه‌ای اجمالی بر محصولات تراریخته و شرح انواع روش‌های شناسایی محصولات تراریخته است. این بخش از کتاب می‌تواند به‌عنوان منبع علمی در رشته‌های بیوتکنولوژی کشاورزی و زیست‌شناسی سلولی و مولکولی کاربرد داشته باشد. بخش دوم کتاب شامل آزمون‌های عملی لازم برای شناسایی محصولات تراریخته است. این فصل از کتاب برای دانشجویان و محققان و نیز برای شرکت‌های دانش

بنیانی که دربارهٔ شناسایی غذاها و بذور گیاهی از نظر بررسی تغییرات ژنتیکی فعالیت می‌کنند، کاربرد دارد.

نویسندگان کتاب در اینجا برخود لازم می‌دانند که بنا به لزوم پاسداشت صداقت و امانت، اعلام نمایند که قسمت اعظم نوشتار کتاب و نیز تصحیحات متنی در مراحل مختلف توسط سرکارخانم ترکان رضایی چیانه انجام شده است و بقیه نویسندگان سهم بسیار کمتری در تهیه این کتاب داشته‌اند.

ضمناً لازم می‌دانیم از کمک‌های پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک به‌ویژه سرکارخانم دکتر هاله هاشمی سهی که در این راه ما را یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی نماییم، و نیز از کمک‌های بی‌دریغ و بی‌شائبه سرکارخانم دکتر زهره حمیدی عضو هیات علمی گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس که یاریگر ما در این راه بودند، سپاسگزاریم.