سنجش کمی بذور تراریخت سویای مقاوم به رانداپ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی

الهام قاضی‌زاده[۱]، امیر موسوی[۲،*] و فرانک هادی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

۲- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۰۸)

چکیده

امروزه زیست فناوری گیاهی راهکار مناسبی را در جهت توسعه مواد غذایی مشتق از محصولات تراریخته فراهم نموده است. در ایران نیز با توجه به اینکه عمده سویای مصرفی به‌صورت وارداتی بوده، انجام برچسب‌گذاری این محصولات از لحاظ کیفی و کمی همواره مد نظر بوده است. مطالعات وسیعی بر روی تجزیه و تحلیل کیفی محصولات تراریخته با استفاده از راه‌کارهای مولکولی انجام گرفته است. در این مطالعه، از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real-time PCR)، برای شناسایی کیفی و کمی بذور سویای تراریخته مقاوم به رانداپ در سطح توالی پیش‌بر CaMV 35S سویای مقاوم به رانداپ نسبت به توالی ژن خانه‌دار لکتین استفاده شد. بررسی‌ها برای تعیین میزان دقیق حضور مواد تراریخته در دو نمونه بذر وارداتی انجام گرفت که سنجش مبتنی بر توالی پیش‌بر CaMV 35S، میزان حد آستانه تشخیص کمتر از یک درصد را نشان داد. میزان حساسیت و دقت این روش، مطابق استانداردهای تجاری برای برچسب‌گذاری نمونه‌های بذری می‌باشد. لذا، برای اولین بار، از یک روش کمی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تعیین دقیق درصد محتوای تراریخته یک توده بذر تجاری در ایران استفاده به‌عمل آمد.

واژگان کلیدی: حد آستانه، سویای مقاوم به رانداپ، گیاهان تغییریافته ژنتیکی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **m-amir@nigeb.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]

[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]

مقدمه

امروزه تولید گیاهان تراریخت از جمله عمده‌ترین کاربردهای زیست‌فناوری نوین در کشاورزی می‌باشد. در حال حاضر، انتقال ژن از طریق مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخت در مواردی همچون مقاومت به آفات، بیماری‌ها، علف‌کش‌ها، بهبود کیفیت محصولات و تولید مواد دارویی با سرعت زیادی رو به افزایش است (Querci *et al*., 2006; Rabiei *et al*., 2013). سطح زیر کشت این قبیل گیاهان در جهان طی سال‌های اخیر با روند تصاعدی افزایش یافته، به‌طوری که کشت گیاهان تراریخت با سطح زیر کشت در حدود ۱/۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ بلافاصله بعد از تولید آن‌ها آغاز شد و در سال ۲۰۱۳ سطح زیر کشت این گیاهان ۱۷۵ میلیون هکتار در جهان گزارش شده است. این مطلب نشان دهنده رشد سریع محصولات تراریخت در جهان می‌باشد. این محصولات در ۲۸ کشور شامل ۲۰ کشور در حال توسعه و ۸ کشور صنعتی کشت می‌شوند. مساحت زیر کشت محصولات تراریخت در آمریکا ۶۹/۵ میلیون هکتار و در پنج کشور اروپایی نیز در حال توسعه است. بیش از ۵۰ درصد این مساحت مربوط به گیاهان دارای صفت مقاومت به علف‌کش است (James, 2013). گرچه تا اکنون اثرات منفی قابل‌توجهی از مشتقات غذایی تراریخت مورد تأیید بر روی سلامت انسان و حیوانات تغذیه‌کننده از آن‌ها گزارش نشده است، با این وجود برای حفظ سلامت جامعه و محیط‌زیست، همچنین برای رعایت حقوق مصرف‌کنندگان برای اطلاع از نوع مواد تراریخت مواد غذایی موجود در بازار، دولت‌ها قوانینی برای نظارت بر روی تولید و جابه‌جایی بذور تراریخت و استفاده از آن‌ها در مشتقات غذایی وضع کرده‌اند. لذا، پروتکلی با عنوان "کارتاهنا" تصویب گردیده است که در آن اثرات احتمالی موجودات تغییریافته ژنتیکی (Genetically Modified Organisms) در جامعه، بر روی سلامت مصرف‌کنندگان مطرح شده است. با افزایش ورود محصولات تغییریافته ژنتیکی در بازارهای جهانی، کمیسیون استاندارد اروپا، تمامی زیر واحدهای اروپایی را وادار به برچسب‌دار کردن محصولات حاوی مقادیر بالاتر از ۰/۹ درصد از DNA تراریخت کرده‌اند. گرچه برچسب‌دار کردن محصولات تراژن، توسط بسیاری از کشورها اجباری نیست، اما اکثر کشورهای مصرف‌کننده و تولیدکننده محصولات تراریخت در پیروی از این قوانین، آزمایش‌های جامع و حساسی را در زمینه تشخیص کیفی و کمی درصد عناصر تراژن انجام می‌دهند (Gurel *et al*., 2011). سویای تراریخت فراوان‌ترین محصول زراعی تراریخت است (Ovesna *et al*., 2010). لذا به‌کارگیری روش‌های مناسب برای شناسایی دقیق سویای تراریخت ضروری می‌باشد. یکی از روش‌های حساس و دقیق برای سنجش کمی، استفاده از Real-time PCR به‌عنوان یک روش کمی (QPCR) می‌باشد (Marmiroli *et al*., 2008). در روش Real-time PCR، سنجش کمی در مرحله نمایی صورت می‌گیرد، یعنی به جای تعیین محصول تکثیر یافته در فاز انتهایی، آن‌ها را در زمان واقعی خود می‌سنجند. بر اساس شدت سیگنال فلورسنت تولید شده در طول واکنش، میزان تکثیر اندازه‌گیری شده و نمودار استاندارد به‌عنوان مرجع برای کمی کردن اطلاعات حاصل به‌کار می‌رود (Ingham *et al*., 2001; Paoletti *et al*., 2006). محتوای GMO یک نمونه، عبارت است از درصد مقدار ماده تغییریافته ژنتیکی در مقدار کل عناصر. برای تخمین این درصد با استفاده از روش Real-time PCR لازم است به‌منظور استاندارد کردن مقدار DNA هدف حاوی GMO خاص در هر واکنش از یک ژن خانه‌دار به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شود؛ بنابراین، در آنالیز Real-time PCR یک PCR برای شناسایی توالی DNA تغییریافته مورد نظر و PCR دیگری به‌منظور شناسایی ژن مرجع داخلی طراحی شده است. برای کمی‌یابی صحیح ماده تراریخت، واکنش بایستی کاملاً بهینه شده و کارایی آن حداقل ۹۰ درصد باشد. کارایی PCR تحت تأثیر عوامل بسیاری مانند طراحی آغازگر، ترکیب مخلوط واکنش و حضور فزاینده و کاهنده‌ها دارد (Holst-Jensen *et al*., 2006; Hodek *et*

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]
[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]

al., 2009; Bergerova *et al*., 2011). با توجه به این‌که عمده سویای مصرفی ایران به‌صورت بذور و نمونه‌های غذایی وارداتی است و با توجه به این‌که برچسب‌گذاری در توده‌های وارداتی فقط در سطح کیفی انجام می‌گردد، در مطالعات قبلی با استفاده از روش های مبتنی بر PCR مشاهده شد که دو نمونه از بذور وارداتی تراریخت می‌باشند (Ghazizadeh *et al*., In press). لذا در این مطالعه برای اولین بار با استفاده از روش حساس Real-time PCR میزان دقیق درصد عناصر تراریختی توده‌های بذور سویا وارداتی مذکور از نظر کمی سنجیده شده است. بنابراین با توجه به اینکه میزان درصد کم تراریختی در برخی از بذور وارداتی وجود دارد، می‌توان از این پروتکل دقیق، برای سنجش کمی و در صورت لزوم برچسب‌گذاری آن‌ها استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور گیاه سویای تراریخت از یک نمونه محموله بذور وارداتی توسط شرکت ژن آزما پرشیا که با روش مولکولی PCR تراریختی آن‌ها تائید شده بود و نمونه‌های تیپ وحشی از مرکز تحقیقات دانه‌های روغنی تهیه گردید. مواد مرجع قابل‌اعتماد (Certified Reference Material) از سویای تراریخت استاندارد از شرکت Fluka (Buchs SG, Switzerland) به‌صورت پودرهای هموژنیزه شده‌ی خشک شامل ۱، ۵ و ۰/۱ درصد سویای تراریخت خریداری گردید.

استخراج DNA ژنومی:

در این مرحله جهت استخراج DNA الگوی با کیفیت و کمیت مناسب، از بافت بذری سویا، دو روش مختلف مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

۱- روش Wizard بهینه شده: استخراج DNA با استفاده از روش Wizard (Spoth and Strauss, 1999) که تأیید شده از طرف سازمان استاندارد جهانی می‌باشد، صورت گرفت، با این تفاوت که در بافر TNE، ۱٪ BME اضافه شد و بقیه مراحل کار همانند پروتکل اجرایی اجرا شد.

۲- روش بهینه شده CTAB استخراج DNA با استفاده از روش ارائه شده توسط Murray و Thompson (Murry and Thompson, 1980) که مورد تأیید سازمان استاندارد جهانی می‌باشد، انجام شد. با این تفاوت که در بافر CTAB، ۱٪ BME اضافه شد. بقیه مراحل کار همانند روش قبل انجام شد.

طراحی آغازگر و کاوشگر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

آغازگرهای طراحی شده در این واکنش برای عناصر ژنی پیش‌بر مربوط به کاست ژنی سویای تراریخت مقاوم به رانداپ می‌باشد. همچنین برای ژن خانه‌دار لکتین اختصاصی سویا یک جفت آغازگر داخلی و خارجی طراحی و ساخته شد. به‌منظور طراحی آغازگرها از برنامه primer3 (Untergasser *et al*., 2007) استفاده شد. کاوشگرها از شرکت Liege بلژیک خریداری شدند. مشخصات آغازگرها و کاوشگرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

سنجش کمی ماده تراریختی در بذور با روش Real-time PCR:

واکنش PCR بر روی نمونه‌های CRM شامل ۱، ۵ و ۰/۱ درصد تراریختی برای توالی ژن لکتین و پیش‌بر CaMV 35S با کمک آغازگرها و کاوشگرهای مربوطه با کیت میکرولیتر در ترموسایکلر ABI -prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام شد. بدین منظور در ۱۷/۵ میکرولیتر Taqman Universal PCR Master Mix، ۱۷/۵ میکرولیتر Taqman Universal PCR Master Mix، ۱/۵ واحد از DNA پلیمراز *Taq*، ۲۰ میلی مولار از بافر Tris-Hcl، ۵۰ میلی مولار KCl، ۳ میلی مولار NaCl، ۲۰۰ میکرو مولار dNTP، ۲۰۰ نانو مولار از هر آغازگر، ۲۰۰ نانومولار از کاوشگر و ۲۰۰ نانوگرم DNA اضافه شد. همه واکنش‌ها در ۳ تکرار و برای ژن لکتین و توالی پیش‌بر به‌صورت جداگانه انجام گرفت. پلاسمیدهای pBI121 وpGEM TA حاوی ژن لکتین به‌ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت برای توالی CaMV 35S و ژن لکتین به‌کار رفت. همچنین از آب به‌عنوان کنترل منفی (NTC) و یا واکنش بدون DNA الگو (NAC) جهت تأیید عدم آلودگی استفاده شد.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]
[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]

جدول ۱- مشخصات آغازگرها و کاوشگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Characteristics of the primers and probe used in this study

اختصاصیت Specificity	نام Name	توالی '5 به '3 Sequence (5' - 3')	اندازه محصول تکثیر یافته Amplicon length (bp)	منبع Reference
پیش‌بر 35S 35S promoter	35S1-35S2	GCTCCTACAAATGCCATCAGATA GTGGGATTGTGCGTCA	195	(Lipp *et al*., 1999)
	35S-FAM (probe)	FAMCAAAGATGGACCCCCACCCA CGTAM		(Corbisier *et al*., 2005)
لکتین Lectine	GMO3-GMO4	GCCCTCTACTCCACCCCCATCCGC CCATCTGCAAGCCTTTTTGTG	118	(Lin *et al*., 2000)
	Lectine-TMP (probe)	TAMAACCGGTAGCGTTGCCAGCT TCG-VIC		(Corbisier *et al*., 2005)

شرایط واکنش شامل یک چرخه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، یک چرخه در دمای۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ٤٥ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و ٦۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه انجام شد. شدت فلورسنت به‌طور پیوسته در حین واکنش PCR نمایش داده شده است.

برای نمودارهای تکثیر ژن لکتین و پیش‌بر 35S ارزش حد آستانه چرخه (Ct) تعیین شد. خط آستانه، سطحی از شناسایی می‌باشد که شدت فلورسنت بالاتر از خط زمینه است. این سطح در فاز لگاریتمی قرار داشته در نتیجه، سیکل آستانه (Ct) یک معیار تشخیص بوده که نشان دهنده این است که نمونه سطح آستانه را قطع کرده است؛ بنابراین با استفاده از منحنی استاندارد به‌دست آمده از نرم‌افزار، Ct و تعداد نسخه مربوط به توالیCaMV 35S و ژن خانه‌دار لکتین در نمونه‌ها تخمین زده شد. در نهایت درصد تراریختی برحسب 100 × مقدار لکتین / مقدار تراریختی CaMV 35S = CaMV 35S تراریختی محاسبه شد. با ایجاد سری رقت‌های DNA هدف حضور مهارکننده‌ها کنترل شد، زمانی که اختلاف بین Ct آن‌ها به ۳/۳ رسید می‌توان گفت هیچ‌گونه مهارکننده‌ای وجود ندارد و از نمونه DNA به‌عنوان الگو برای واکنش PCR می‌توان استفاده نمود.

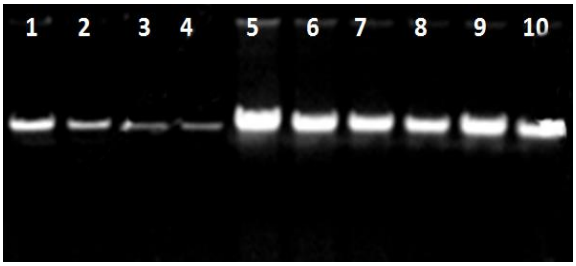
نتایج و بحث

با توسعه وسیع گیاهان تراریخت و به‌کارگیری این محصولات در فرآورده‌های غذایی، برچسب‌گذاری توده بذور وارداتی و مشتقات آن‌ها امری ضروری می‌باشد (Wang and Fang, 2005). سویا از جمله محصولات زراعی است که بخش عمده آن به‌صورت وارداتی می‌باشد. لذا، به‌کارگیری روش و پروتکل مناسب جهت ارزیابی دقیق میزان تراریختی این محصول از اهمیت بالایی برخوردار است. استخراجDNA با کیفیت اولین قدم در آنالیز محصولات زراعی تراریخت می‌باشد (Vrablik *et al*., 2012)، بنابراین استخراج DNA با چندین روش انجام گردید و با توجه به مقایسه غلظت و کیفیت DNA حاصل، روش CTAB برای تهیه DNA مناسب تشخیص داده شد. الگوی الکتروفورز DNA استخراج شده به روش‌های CTAB و Wizard از بافت بذور سویا در شکل ۱ آمده است. در مطالعه حاضر، با روش کمی بسیار دقیق Real-time PCR تکثیر محصولات در فاز نمایی سنجیده شد، لذا دقت بیشتری نسبت به سایر روش‌های PCR که میزان محصولات را در پایان واکنش می‌سنجند، دارد. به‌کارگیری روش Real-time PCR برای تعیین میزان تراریختی محصولاتی که حاوی میزان کمی درصد تراریختی می‌باشند و یا مشتقات غذایی پردازش یافته مناسب می‌باشد؛ زیرا ممکن است واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قادر به تشخیص میزان کم عنصر دست‌ورزی شده

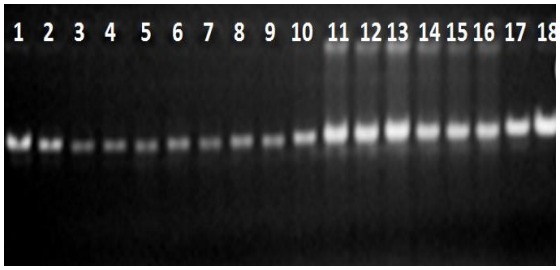
[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]
[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]

در فاز نهایی نباشد. از طرف دیگر بعضی از مشتقات غذایی حاوی چندین عنصر تراریختی هستند، در این حالت بایستی درصد تراریختی هر عنصر به‌طور دقیق مشخص شود. لذا در این مطالعه تلاش بر این بوده است تا برای اولین بار در کشور با روش دقیق Real-time PCR میزان تراریختی بذور وارداتی تعیین و یک پروتکل جامع با حداقل خطا برای تشخیص سریع GMOs در تمامی آزمایشگاه‌ها ارائه شود. با توجه به اینکه پیش‌بر 35S ویروس موزاییک کلم در حدود ۹۵ درصد محصولات تراریخت تجاری وجود دارد، لذا یکی از مهم‌ترین گزینه‌ها برای غربالگری محصولات تراریخت زراعی می‌باشد (Lin *et al*., 2000). بنابراین میزان فلورسنت توالی لکتین وCaMV 35S در سری رقت‌های مختلف نمونه‌های استاندارد CRM و دو نمونه مجهول مربوط به بذور وارداتی محاسبه شد. منحنی استاندارد برای عنصر اختصاصی CaMV 35S و ژن لکتین به‌عنوان یک کنترل داخلی رسم گردید. منحنی‌های استاندارد مربوط به توالی‌های لکتین و پیش‌بر 35S با هم متفاوت بوده و در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. یک ارتباط خطی بین لگاریتم DNA ورودی و آستانه سیکل وجود دارد. برای تأیید صحت نتایج، هر واکنش۳ بار انجام شد. لکه‌های آبی موجود در منحنی استاندارد، حد آستانه به‌دست آمده برای توالی‌های مذکور در سری رقت‌های نمونه‌های CRM بوده است و نقطه قرمز به‌دست آمده بر روی منحنی استاندارد مربوط به نمونه کنترل مثبت می‌باشد. شیب خط مربوط به هر منحنی استاندارد با کمک نرم‌افزار ANOVA به‌دست آمده است. معادله‌های مربوط به منحنی‌های استاندارد برای توالی‌های لکتین و پیش‌بر CaMV 35S به‌ترتیب به‌صورت $y = -0.3505x + 12.369$ و $y = -0.5392x + 16.65$ می‌باشد. همچنین حد آستانه و تعداد نسخه برای هر توالی محاسبه و در جدول ۲ آمده است، سپس درصد تراریخت بودن را بر اساس درصد نسبت میزان CaMV 35S بر مقدار لکتین محاسبه شد (جدول ۳).

در این مطالعه آنالیز بر روی دو نمونه از بذور وارداتی انجام شده است. در دو نمونه مذکور قبلاً با روش‌های مولکولی PCR معمولی، حضور عناصر تراریخت به‌صورت کیفی و نیمه کمی گزارش شده است (Ghazizadeh *et al*., Inpress). در این مطالعه سعی شده است با روش حساسReal-time PCR میزان دقیق عناصر تراریخت در دو نمونه بررسی شود. نتایج نشان داد نمونه اول دارای ۰/۹۷۸ درصد و نمونه دوم دارای ۰/۵۷ درصد عنصر تراریختی می‌باشد.



A

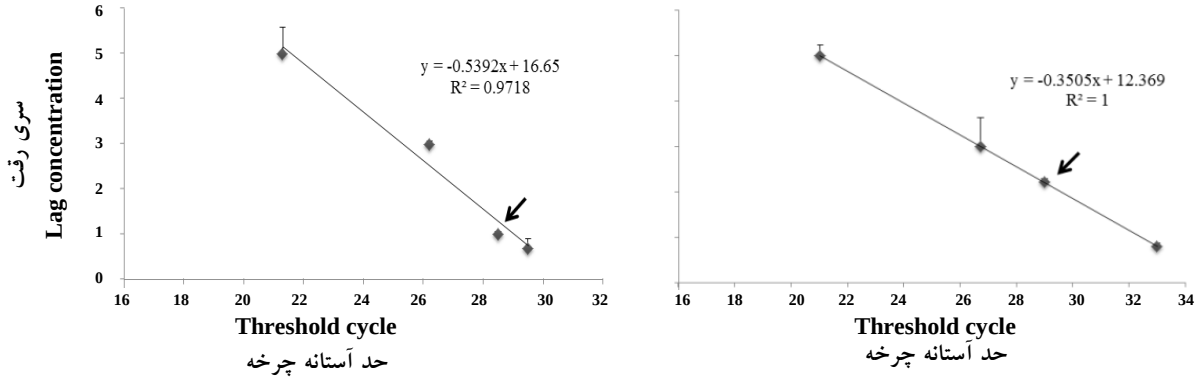


B

شکل ۱- مقایسه الگوی الکتروفورزی DNA ژنومیک استخراج شده با روش‌های CTAB و Wizard بر روی ژل آگارز یک درصد که به‌ترتیب با حروف A و B نشان داده شده‌اند. A) چاهک‌های شماره ۱ و ۲: به‌ترتیب ۵۰ نانو گرم DNA ژنومی، چاهک های ۳ و ٤: ۲۵ نانو گرم DNA ژنومی، چاهک‌های ۵-۱۰: ۱۰۰ نانو گرم DNA ژنومی؛ B) چاهک‌های ۱-۵: ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، چاهک‌های ٦-۱۱: ۲۵ نانو گرم DNA ژنومی، چاهک‌های ۱۲-۱۸: ۱۰۰ نانو گرم DNA ژنومی.

Figure 1. Comparison between electrophoretic patterns of extracted genomic DNA on %1 agarose using methods of CTAB and Wizard shown by A and B letters, respectively. A) Lanes 1 and 2: 50 ng of DNA, lanes 3 and 4: 25 ng of DNA, lanes 5-10: 100 ng of DNA; B), Lanes 1-5: 50 ng of DNA, lanes 6-11: 25 ng of DNA, lanes 12-18: 100 ng of DNA.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]
[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]



B A

شکل ۲- A) منحنی استاندارد مربوط به توالی ژن لکتین بر روی نمونه‌های CRM شامل ۰/۱، ۱ و ۵ درصد تراریختی. نقاط موجود در منحنی استاندارد، حد آستانه به‌دست آمده برای توالی‌های مذکور در سری رقت‌های نمونه‌های CRM بوده است و نقطه نشان داده با فلش، مربوط به ناقلpGEM TA حاوی ژن لاکتین به‌عنوان کنترل مثبت می‌باشد. (B) منحنی استاندارد مربوط به توالی پیش برCaMV 35S بر رو نمونه‌های CRM شامل ۱٪ و ۵٪ و ۰/۱٪ تراریختی. نقاط موجود در منحنی استاندارد، حد آستانه به‌دست آمده برای توالی‌های مذکور در سری رقت‌های نمونه‌های CRM بوده است و نقطه نشان داده با فلش، مربوط به ناقل pGEM TA حاوی ژن CaMV 35S به‌عنوان کنترل مثبت می‌باشد.

Figure 2. (A), Standard curve of lectin gene for CRM samples containing 0.1%, 1%, 5% or 2% GM-soya. The dot that are indicated by the arrow shows the limit of detection for mentioned sequences in serial dilution of CRM samples. Arrow indicates pGEM TA vector containing lectin gene as the positive control. (B), Standard curve of CaMV 35S promoter for CRM samples containing 0.1%, 1%, 5% or 2% GM-soya. The dot that are indicated by the arrow shows the limit of detection for mentioned sequences in serial dilution of CRM samples. arrow indicates pGEM TA vector containing CaMV 35S promoter as the negative control

جدول ۲- حد آستانه و تعداد نسخه مربوط به توالی لکتین و توالی CaMV 35S برای سری رقت‌های نمونه‌های CRM بذور سویا

Table 2. Limit of detection and copy No. of Lectin and CaMV 35S sequences in a serial dilution of CRM samples

لکتین (Lectine)		CaMV 35S	
نسخه (Copy)	Ct (حد آستانه چرخه)	نسخه (Copy)	Ct (حد آستانه چرخه)
100000	21.55	100000	31.21
1000	27.55	1000	26.21
10	32.98	10	28.51

جدول ۳- نتایج حاصل از سنجش میزان درصد عنصر تراریختی بذور سویا با روش real-time PCR

Table 3. Estimation of the percentage of GM material in the soybean seeds by real-time PCR

نمونه‌های CRM	CRM sample	لکتین Lectin	CaMV 35S	لکتین /CaMV 35S CaMV 35S/ Lectin	درصد عنصر تراریختی % GM
سویا ۰٪ تراریخت	0% GM-soya	4.282	تعیین نشد Not detected	تعیین نشد Not detected	تعیین نشد Not detected
سویا ۰/۱ درصد تراریخت	0.1% GM-soya	4.478	0.0044	0.0010	0.10
سویا ۱ درصد تراریخت	1% GM-soya	4.567	0.0461	0.0101	1.10
سویا ۵ درصد تراریخت	5% GM-soya	4.502	0.2494	0.0554	5.54
نمونه مجهول شماره ۱	Un known sample No. 1	4.312	0.04182	0.0097	0.97
نمونه مجهول شماره ۲	Un known sample No. 2	4.282	0.0244	0.0057	0.57

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]
[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]

سپاسگزاری

مولفان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری بابت حمایت از این مطالعه (طرح پژوهشی ۳۶۷) سپاسگزاری می نمایند.

References

Bergerova, E., Godalova, Z. and Siekel, P. (2011). Combined effect of temperature, pressure and low pH on the DNA amplification of plant derived foods. *Czech Journal of Food Sciences*, **29**: 337–345.

Corbisier, P., Trapmann, S., Gancberg, D., Hannes, L., Van Iwaarden, P., Berben, G., Schimmel, H. and Emons, H. (2005). Quantitative determination of Roundup Ready soybean (Glycine max) extracted from highly processed flour. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **383**: 282–290.

Ghazizadeh, E., Mousavi, A., Hadi, F. and Hashemi Sohi, **H**. Detection of Transgenic Roundup Ready Soybean Seeds by Molecular Methods**.** *Iranian Journal of Biology*, In press.

Gurel, F., Arican, E., Gozukirmizi, N. and Ari, S., (2011). Recent molecular tools for detecting transgenic events in genetically modified (GM) crop products. *Scientific Research and Essays*, **6**: 5091-5099.

Hodek, J., Ovesna, J. and Kucera, L. (2009). Interferences of PCR effectivity: importance for quantitative analyses. *Czech Journal of Food Sciences*, **27**: 42-49.

Holst-Jensen, A., De Loose, M. and Van Den Eede, G. (2006). Coherence between legal requirements and approaches for detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 2799–2809.

Ingham, D.J., Beer, S., Money, S. and Hansen, G. (2001). Quantitative Real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques*, **31**: 132-4, 136-40.

James, C. (2013). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), Ithaca, NY.

Lin, H. Y., Chiueh, L. C. and Shih, D. Y. C. (2000). Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. *Journal of Food and Drug Analysis***, 8**: 200-207.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, **82**: 923-928.

Marmiroli, N., Maestri, E., Gulli, M., Malcevschi, A., Peano, C., Bordoni, R. and De Bellis, G. (2008). Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**: 369-384.

Murray, H.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**: 4321-4325.

Ovesna, J., Kucera, L., Hodek, J. and Demnerova, K. (2010). Reliability of PCR based Screening for Identification and Quantification of GMOs. *Czech Journal of Food Sciences*, **28**: 133-138.

Paoletti, C., Heissenberger, A., Mazzara, M., Larcher, S., Grazioli, E., Corbisier, P., Hess, N., Berben, G., Lubeck, P.S., De Loose, M., Moran, G., Henry, Ch., Brera, C., Folch, I., Ovesna, J. and Van den Eede, G. (2006). Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. *European Food Research and Technology*, **224**: 129-139.

Querci, M., Jeremini, M. and Van den Eede, G. (2006). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. User Manual. JRC.

Rabiei, M., Mehdizadeh, M., Rastegar, H., Vahidi, H. and Alebouyeh, M. (2013). Detection of Genetically Modified Maize in Processed Foods Sold Commercially in Iran by Qualitative PCR. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **12**: 25-30

Spoth, B. and Strauss, E. (1998). Screening for genetically modified organisms in food using, Promega's Wizard resin. *Promega Notes*, **73**: 23-25.

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. and Leunissen, J.A.M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, **35**: 71-74.

Vrablik, A., Hodek, J., Soukup, J. and Demnerova, K. J. (2012). Development and Verification of PCR based Assay to Detect, and Quantify Garden Pea lec Gene, *Czech Journal of Food Sciences*, **30**: 247-257.

Wang, W. and Fang, T. (2005). Development of Multiplex and Quantitative PCR Assay to Detect Genetically Modified Roundup Ready Soybean in Foods. *Journal of Food and Drug Analysis***, 13**: 132-138.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]

[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]

Quantitative Detection of Transgenic Roundup Ready Soybean Seeds Using Real-time PCR Method

Elham Ghazizadeh[1], Amir Mousavi[2,*] and Faranak Hadi[3]

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran

(Received: January 12, 2014 – Accepted: April 28, 2014)

Abstract

As genetically modified organisms (GMOs) development is now increasing, detection and determination of their quantitative threshold using reliable methods would be necessary. The goal of this study was to introduce a sensitive method for qualitative and quantitative detection of Roundup-ready soybean samples. For primary screening, semi-quantitative molecular assays have been used for detection of various percentages of transgenic and non-transgenic Roundup-ready soybean samples. Furthermore, an experiment was conducted using the CaMV 35S primers in combinations with soybean lectin-specific primers in two imported samples of soybean seeds. Real-time PCR-based analysis indicated that the amount of GMO material in the seeds and the limit of detection (LOD) obtained for 35S sequence was less than 1%. The sensitivity and accuracy of this method had conformity with the international standards of seed labeling. This is the first report of its type for quantitative detection of a genetically modified material in a commercial seed lot in Iran.

Keywords: Limit of detection, Genetically modified crop, Roundup ready soybean

[*] **Corresponding Author, E-mail: m-amir@nigeb.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-05-19]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1393.1.2.7.4]
[DOI: 10.29252/pgr.1.2.71]