

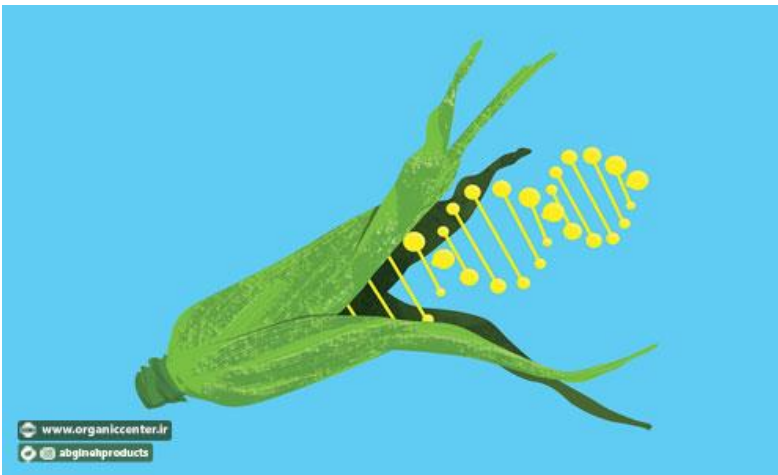
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

محصولات تراریخته و روش‌های شناسایی آن

آزمایشگاه کنترل غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
دکتر خدیجه موسوی

محصولات تراریخته (Genetically Modified Organisms - GMOs)

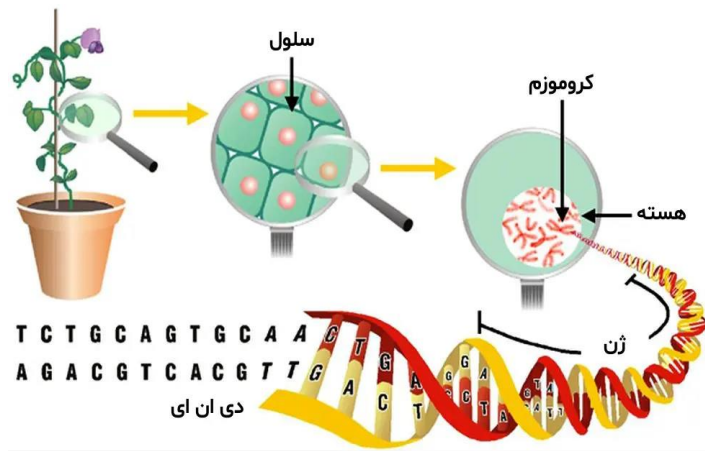
محصولات تراریخته (GMOs) موجوداتی هستند که DNA آنها به صورت مصنوعی تغییر یافته و دارای ژن‌های جدیدی هستند که به طور طبیعی در ژنوم آنها وجود ندارد. فناوری DNA نو ترکیب، اساس تولید این محصولات است که به دانشمندان اجازه می‌دهد ژن‌های خاصی را از یک موجود زنده به موجود زنده دیگر منتقل کنند (باکتری متداول در انتقال ژن به گیاهان *Agrobacterium tumefaciens* است).



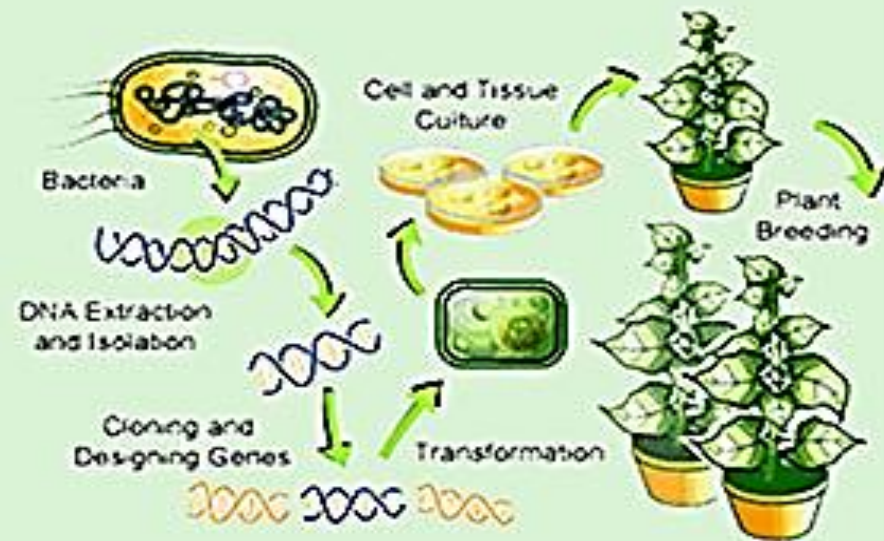
DNA چیست؟

DNA (Deoxyribonucleic Acid) ماده ژنتیکی همه موجودات زنده است که اطلاعات لازم برای ساخت و عملکرد بدن را در خود ذخیره می‌کند.

واحدهای سازنده : چهار نوع باز نوکلئوتیدی آدنین (A)، تیمین (T)، سیتوزین (C)، گوانین (G) که در دو رشته با هم ساختار مارپیچی تشکیل می‌دهند.

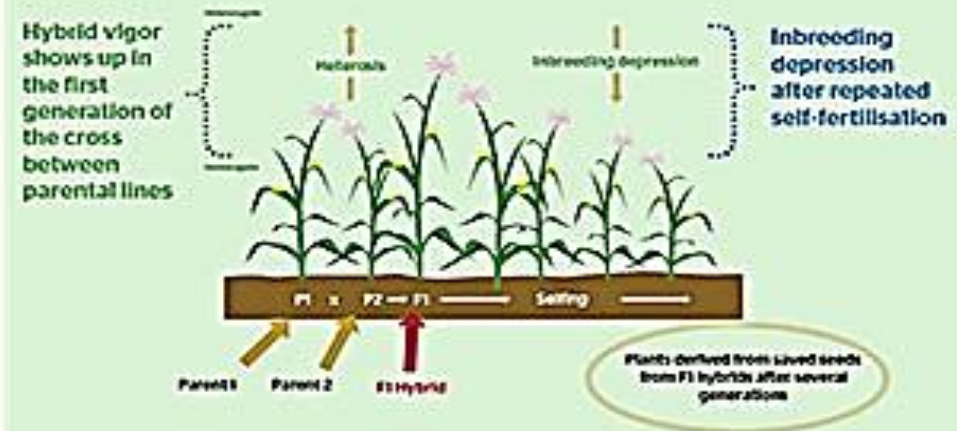


وظیفه : دستورالعمل‌های لازم برای ساخت پروتئین‌ها و کنترل صفات ژنتیکی را فراهم می‌کند.



GMO

Saving seeds of F1 hybrids is not a good idea



Hybrids

تعاریف

- موجود زنده تغییر ژنتیکی یافته (LMO) Living Modified Organism

هرگونه موجود زنده دارای ترکیب جدید مواد ژنتیکی است که با استفاده از فناوری زیستی جدید به دست آمده است .

- موجودات تغییر ژنتیکی یافته (GMO) Genetically Modified Organism

هر موجودی که ماده ژنتیکی آن به صورتی تغییر یابد که بطور طبیعی به وسیله تولید مثل جنسی یا نو ترکیبی طبیعی امکانپذیر نباشد

تعاریف

- مواد غذایی تغییر ژنتیکی یافته (GMF) Genetically Modified Foods

مواد غذایی مشتق شده، حاوی یا حاصل از موجودات تغییر ژنتیکی یافته را شامل می شود.

- رخداد (Event)

موجود زنده تغییر ژنتیکی یافته ای که از نظر نوع و تعداد ژن نو ترکیب وارد شده به ژنوم و محل تلفیق ژن یا ژن های مذکور منحصر به فرد است .

اهداف و دلایل تولید محصولات تراریخته

۱. افزایش عملکرد محصولات کشاورزی
۲. مقاومت به آفات و بیماری‌ها
۳. کاهش استفاده از علف‌کش‌ها و سموم
۴. تحمل شرایط نامساعد محیطی
۵. بهبود کیفیت مواد غذایی
۶. کاهش هزینه‌های تولید
۷. حفظ منابع طبیعی
۸. پاسخ به چالش‌های امنیت غذایی
۹. کاهش ضایعات پس از برداشت
۱۰. ایجاد فرصت‌های تجاری و صادراتی
۱۱. کاهش اثرات زیست‌محیطی
۱۲. تحقیقات علمی و پزشکی

معایب استفاده از محصولات تراریخته

چالش‌های اخلاقی و اجتماعی

خطر تأثیر بر زنجیره غذایی

مسائل حقوقی و تجاری

هزینه‌های تحقیق و توسعه

نگرانی‌های زیست‌محیطی

اثرات بالقوه بر سلامت انسان

وابستگی به شرکت‌های بذر

مقاومت آفات و علف‌های هرز

چالش‌ها و مسائل اخلاقی در استفاده از محصولات تاراریخته

شناسایی و ردیابی، مقاومت آفات، انتقال ژن‌ها، توسعه فناوری	فنی
هزینه‌های بالای بذر، محدودیت‌های تجاری، بیمه و ضمانت	اقتصادی
نگرانی‌های سلامتی و زیست‌محیطی، مسائل اخلاقی، عدم پذیرش عمومی	اجتماعی
عدم هماهنگی بین کشورها، نیاز به تحقیقات بیشتر	سیاست‌گذاری

قوانین و مقررات بین‌المللی و داخلی مربوط به محصولات تغذیه

قوانین بین‌المللی:

کدکس آلیمنتاریوس (Codex Alimentarius):

استانداردهای جهانی برای ایمنی و کیفیت مواد
غذایی.

پروتکل کارتاژنا (Cartagena Protocol):

مدیریت ایمنی زیستی محصولات تغذیه

قوانین داخلی:

الزام به برچسب‌گذاری محصولات حاوی GMO

نظارت بر کشت، واردات و توزیع محصولات

تغذیه

سطح	قوانین و مقررات
بین‌المللی	کنوانسیون تنوع زیستی، پروتکل کارتاژنا، WTO، کدکس آلیمنتاریوس، FAO
داخلی (EU)	سیاست‌های سخت‌گیرانه، اجازه‌دهی دقیق، برچسب‌گذاری اجباری، ممنوعیت کشت
داخلی (USA)	سیاست‌های آزادتر، نظارت توسط FDA، EPA و USDA، برچسب‌گذاری اختیاری
داخلی (ایران)	قانون ایمنی زیستی، مجوزدهی دقیق، برچسب‌گذاری اجباری، ممنوعیت کشت برخی محصولات

روشهای شناسایی محصولات تراریخته

PCR (Polymerase Chain Reaction): روش مولکولی برای شناسایی توالی‌های خاص DNA

Real-Time PCR: برای تعیین مقدار GMO در نمونه با استفاده از نشانگر فلورسنت

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): روش ایمنی‌شناسی برای تشخیص پروتئین‌های خاص

نمونه برداری و آماده سازی نمونه برای آزمایش

نمونه برداری صحیح از مواد غذایی و محصولات کشاورزی برای تست تراریخته نیازمند برنامه ریزی دقیق، رعایت استانداردها و کنترل کیفیت است. با رعایت اصول تصادفی بودن، حجم مناسب و جلوگیری از آلودگی، می توان نتایج دقیق و قابل اعتمادی با هدف نمایاندن وضعیت کلی محصول به دست آورد

اصول نمونه برداری

نمونه‌ها باید به صورت تصادفی از نقاط مختلف بار یا بسته‌ها انتخاب شوند.
تعداد و حجم نمونه‌ها باید به اندازه‌ای باشد که نماینده کل محموله باشد.
از وسایل تمیز و استریل برای نمونه‌برداری استفاده کنید.
از اختلاط نمونه‌ها با مواد خارجی یا آلوده جلوگیری کنید.
نمونه‌ها باید در دمای مناسب نگهداری شوند.
نمونه‌ها باید در ظروف مقاوم و دربسته منتقل شوند.
از ارتعاش، حرارت زیاد یا شرایط نامناسب جلوگیری کنید.

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه برای آزمایش

مرحله	اقدامات ضروری
برنامه‌ریزی	تعیین هدف، شناخت محصول و انتخاب روش نمونه‌برداری
نمونه‌برداری	تصادفی، حجم و تعداد مناسب، جلوگیری از آلودگی
ثبت اطلاعات	ثبت اطلاعات ضروری و برجسته‌گذاری دقیق
نگهداری و انتقال	شرایط مناسب نگهداری و انتقال در ظروف مقاوم
کنترل کیفیت	بررسی ظاهری و ارسال نمونه‌های کنترل مثبت و منفی

استخراج DNA

استخراج DNA با کیفیت بالا و بدون آلودگی از نمونه‌ها (مثل گیاهان، غذاها یا خوراک دام) بسیار حیاتی است.

- استفاده از کیت‌های استخراج DNA یا روش‌های شیمیایی (مانند فنول-کلروفرم)



Pre-treatment steps



Leaf



Homogenization
with LN2



Add Proteinase K
& Plant lysis buffer



Incubation
at 60°C



Take the
supernatant only



Seed



Homogenization
with LN2



Add Proteinase K
& Plant lysis buffer



Incubation
at 60°C



Take the
supernatant only



Genomic DNA Extraction



Add Binding
buffer



DNA binding



Add Washing
Buffer 1



Add Washing
Buffer 2



Drying



Add Elution
buffer

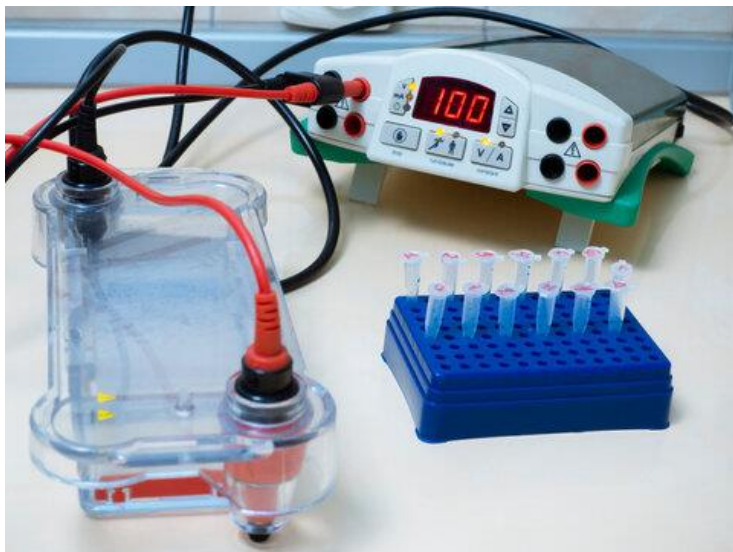


Purified
Genomic DNA

Conventional PCR (معمولی)

یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین تکنیک‌ها در آزمایشگاه‌های مولکولی است که به منظور تکثیر قطعات خاصی از DNA استفاده می‌شود. این روش مقادیر بسیار کم DNA هدف را در نمونه‌ها بصورت کیفی شناسایی میکند

حضور DNA هدف با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز تأیید می‌شود.



ابزارها و مواد مورد نیاز

DNA الگو: نمونه‌ای که حاوی DNA هدف است که در آزمایش GMO از DNA ژنومی به دلیل ثبات بالا استفاده می‌شود

- پرایمرها: دو توالی کوتاه DNA که به دو انتهای DNA هدف متصل می‌شوند.

- DNA پلیمراز: آنزیمی که DNA را سنتز می‌کند (معمولاً Taq Polymerase استفاده می‌شود).

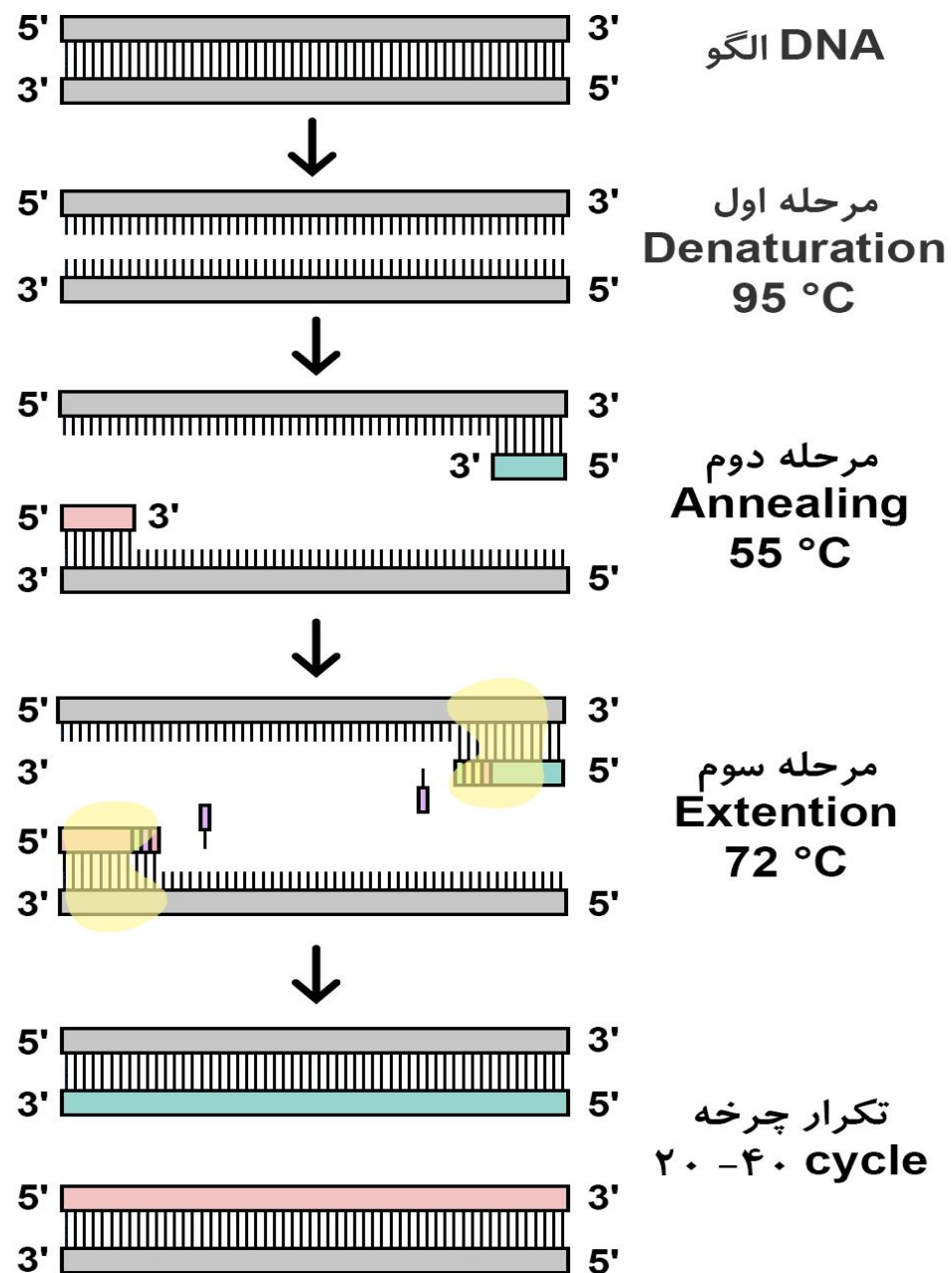
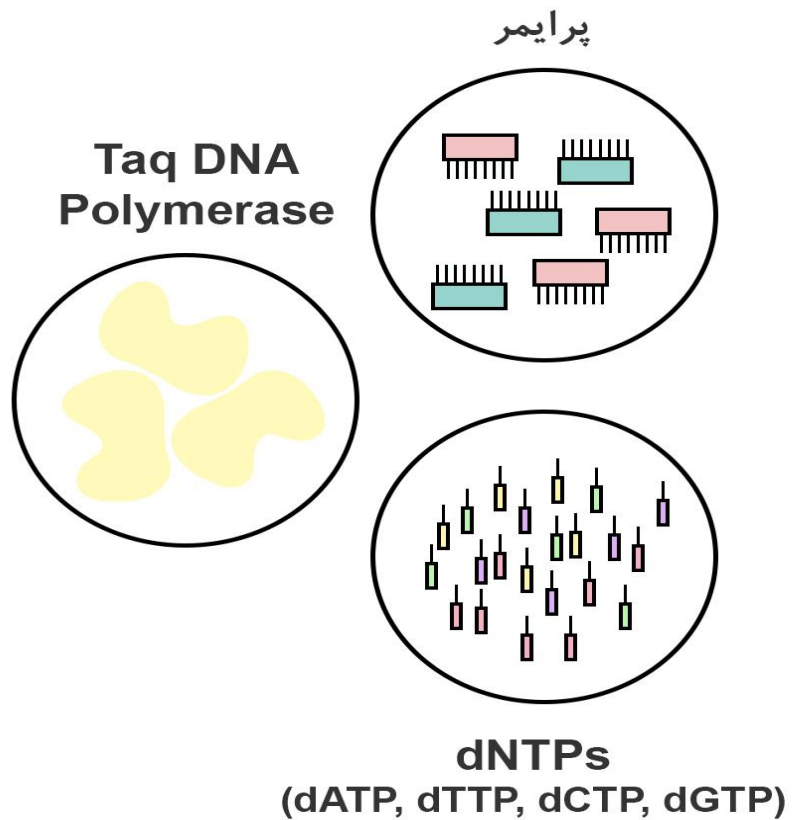
- دی‌اکسی‌نوکلئوتیدها: واحدهای سازنده DNA

- بافر واکنش: محیطی که pH و شرایط لازم برای عملکرد آنزیم را فراهم می‌کند.

- منیزیم کلرید: کوفاکتور ضروری برای فعالیت DNA پلیمراز.

- دستگاه ترموسایکلر: دستگاهی که دما را در مراحل مختلف تنظیم می‌کند





PCR



مرحله ۱: دناتوراسیون (Denaturation)

دمای بالا ($94-98^{\circ}\text{C}$) جدایی دو رشته DNA

مرحله ۲: زوج شدن (Annealing)

دمای پایین ($50-65^{\circ}\text{C}$) اتصال پرایمرها به DNA

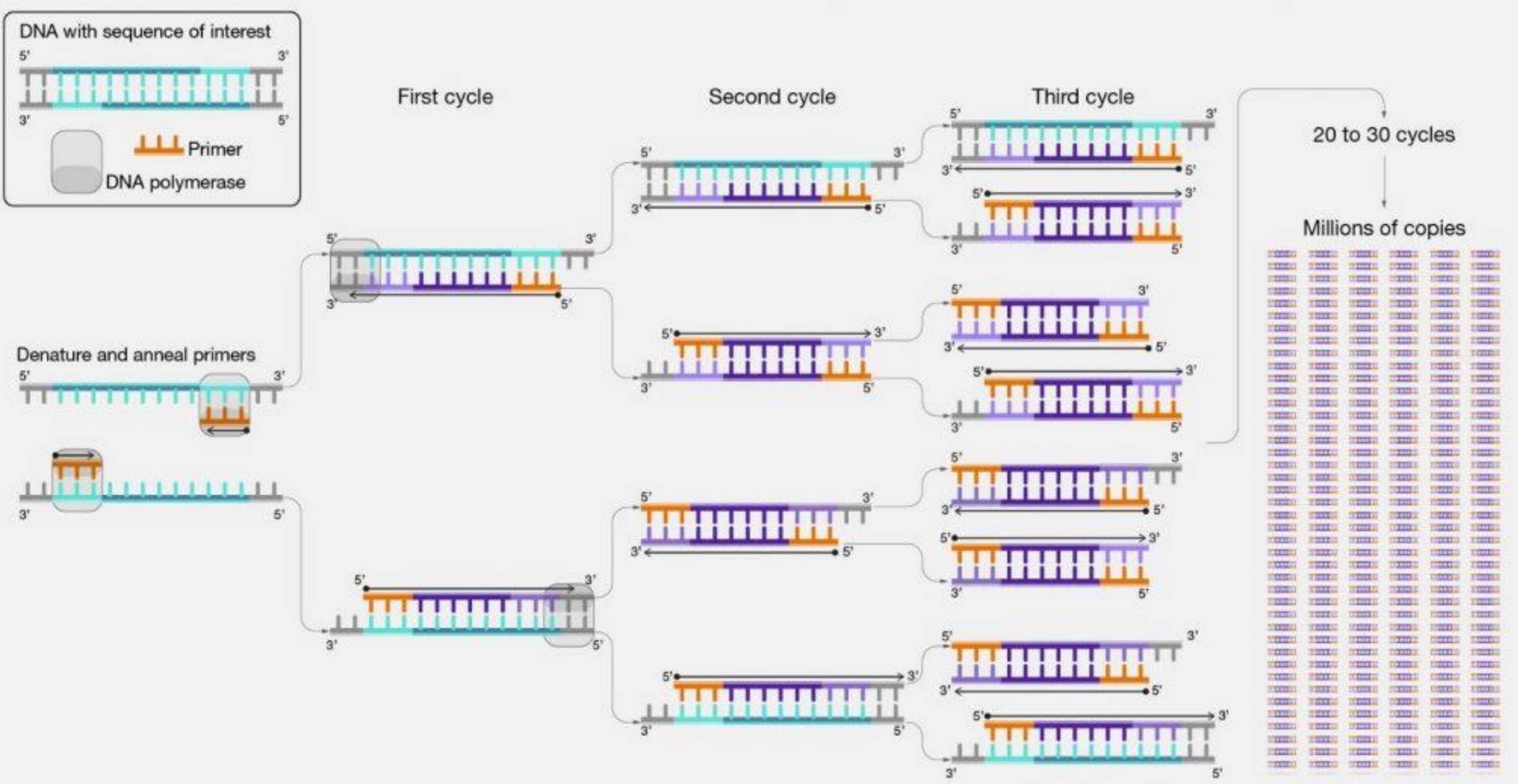
مرحله ۳: افزایش (Extension)

دمای متوسط (72°C) سنتز رشته جدید با آنزیم Taq

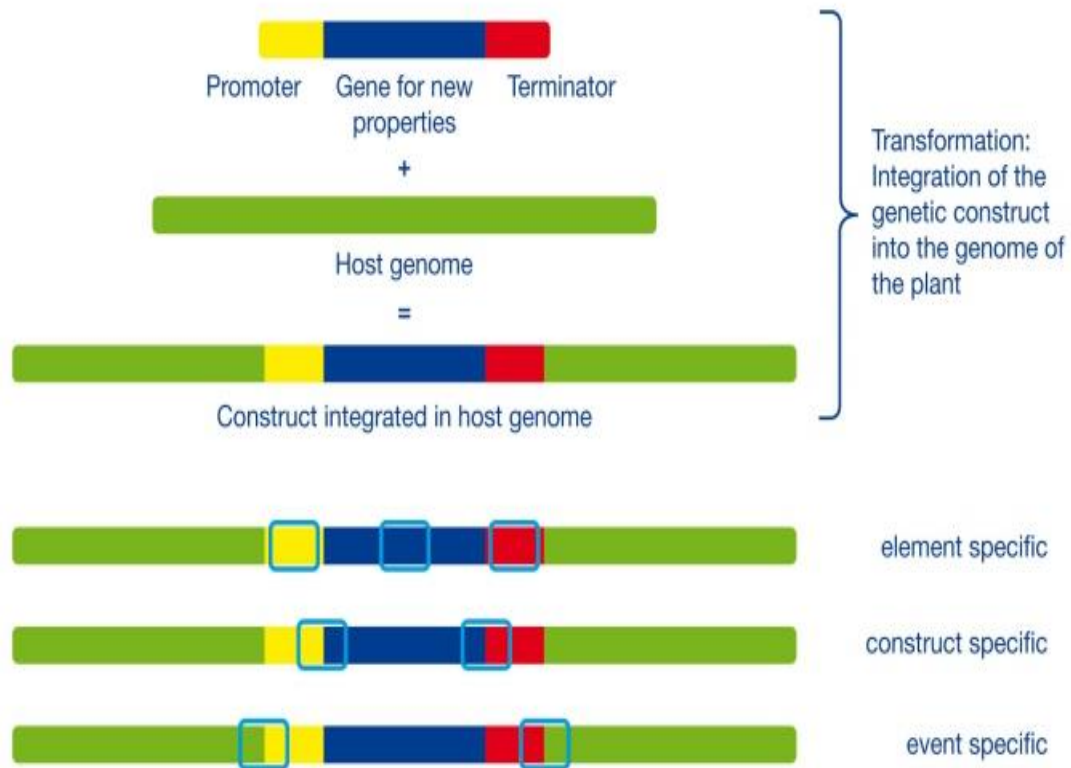
تکرار چرخه

۲۵ تا ۳۵ دور

نتیجه: تولید میلیون‌ها کپی از قطعه مورد نظر DNA



طراحی پرایمرها



- پرایمرها باید به گونه‌ای طراحی شوند که به طور خاص به ژن هدف متصل و باعث تکثیر انتخابی یک قطعه خاص از DNA شوند

- طول پرایمرها معمولاً ۱۸-۲۵ باز است.

برای تشخیص دقیق‌تر و کامل‌تر در تست GMO از چندین پرایمر استفاده می‌شود

روش‌های خاص تاکسون‌های هدف

این روش را نمی‌توان به عنوان یک روش شناسایی در نظر گرفت. ممکن است برای ارزیابی تقویت پذیری DNA استخراج شده استفاده شود.

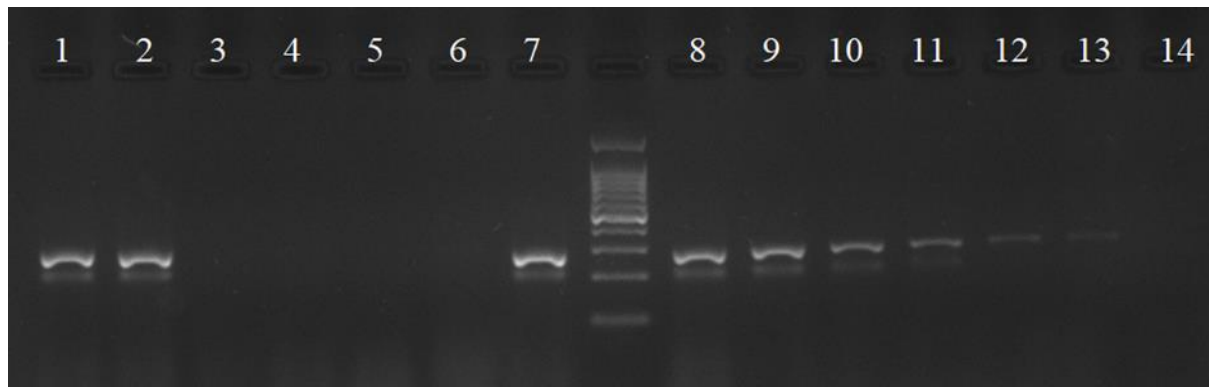
تشخیص اجزای مشتق شده از برنج

تشخیص اجزای مشتق شده از ذرت

تشخیص اجزای مشتق شده از سویا

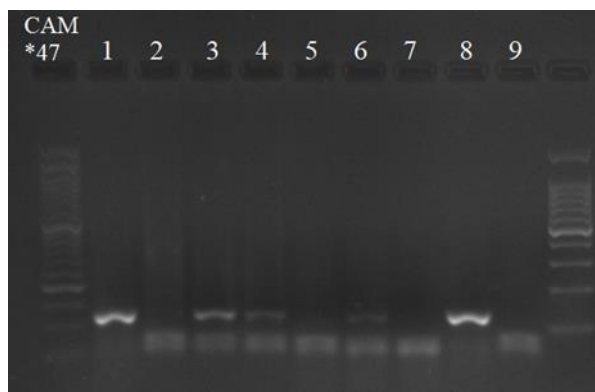
تشخیص اجزای مشتق شده از کلزا

تشخیص اجزای مشتق شده از گوجه فرنگی



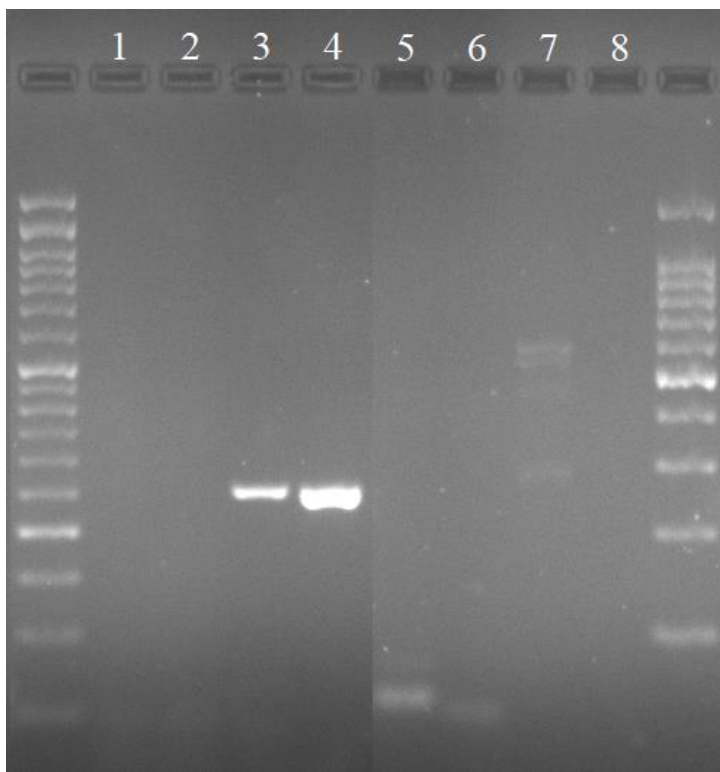
تشخیص ارگانیزم های اصلاح شده ژنتیکی (با پرایمر پروموتور CaMV 35S)

این روشی برای تشخیص توالی DNA با تعداد کمی متغیر از پروموتور 35 S است. به دلیل وجود پروموتور CaMV 35S در بسیاری از گیاهان اصلاح شده ژنتیکی، این روش ممکن است برای غربالگری وجود DNA مشتق شده از گیاهان GM استفاده شود



پروموتور 35 S از ویروس موزاییک گل کلم (CaMV) مشتق شده است، و در نتیجه تشخیص پروموتور CaMV 35S می تواند به دلیل وجود DNA مشتق از GMO و/یا مشتق از CaMV باشد

تشخیص ارگانایسم های اصلاح شده ژنتیکی (با پرایمر ترمیناتور NOS)

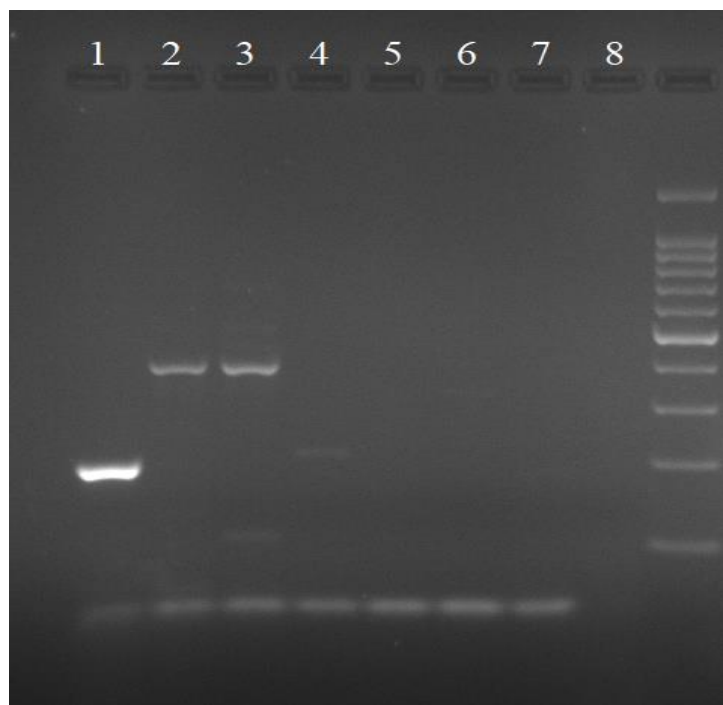


این روشی برای تشخیص توالی DNA با تعداد کپی متغیر از ترمیناتور NOS (*Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase*) است.

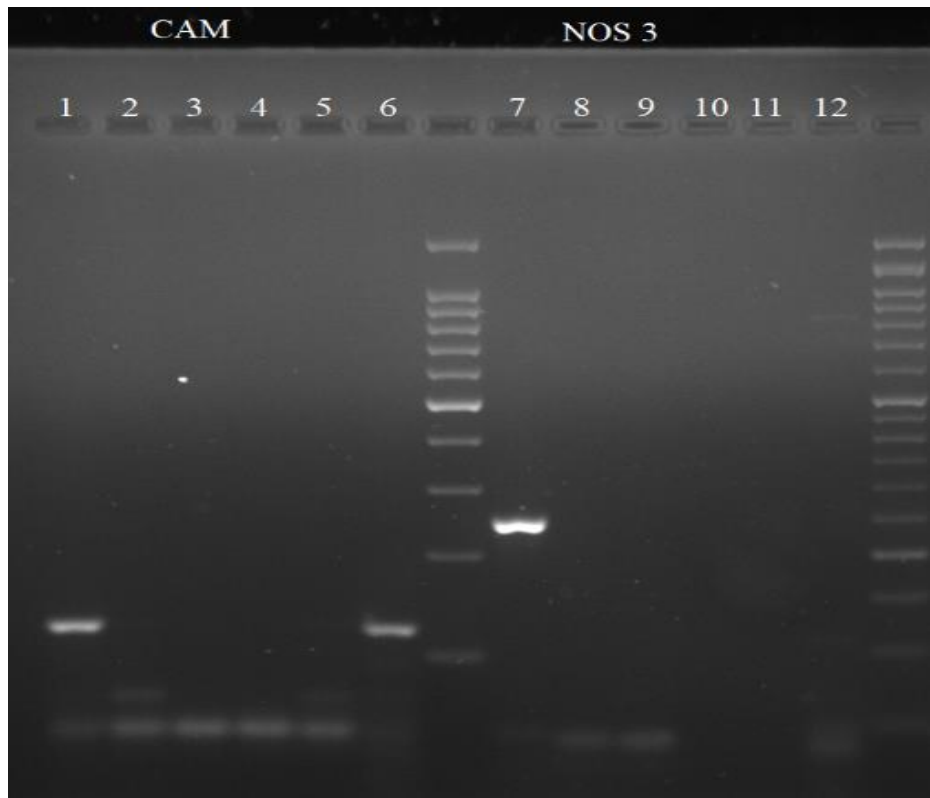
با توجه به وجود پایان دهنده NOS در بسیاری از گیاهان اصلاح شده ژنتیکی، این روش ممکن است برای غربالگری وجود اجزای مشتق شده از گیاهان GM استفاده شود

تشخیص ارگاناسم های اصلاح شده ژنتیکی (با پرایمر پروموتور FMV 34S)

این روش برای شناسایی توالی DNA پروموتور ویروس موزاییک انجیر (FMV 34S) در کلزا RT73 و در سایر گیاهان GM که حاوی پروموتور FMV 34S هستند، قابل استفاده است. می توان از آن برای غربالگری وجود DNA مشتق شده از گیاهان GM حاوی این عنصر ژنتیکی استفاده کرد.



کنترل کیفیت



- کنترل مثبت (Positive Control) :
نمونه‌ای که حاوی DNA هدف است و برای
تایید عملکرد صحیح روش استفاده می شود .
- کنترل منفی (Negative Control) :
نمونه‌ای بدون DNA برای بررسی آلودگی.

تفسیر نتایج

در PCR معمولی، نتایج با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز بررسی می‌شوند.

باندهای DNA هدف باید در اندازه مورد انتظار ظاهر شوند.

شناسایی مثبت توالی DNA هدف خاص ممکن است با روش مناسبی غیر از تعیین اندازه محصول PCR تأیید شود:

- هیبریداسیون محصول PCR با پروب های خاص

- با انجام آنالیزهای محدودکننده که باید طول قطعات محصول PCR حاصل با طول مورد انتظار توالی DNA هدف پس از برش مطابقت داشته باشد

- تعیین توالی محصول PCR

بیان نتیجه

منفی

برای نمونه X ، دنباله هدف Y شناسایی نشد.
ممکن است مقدار DNA هدف استخراج شده از گونه X کمتر از LOD باشد.

مثبت

"برای نمونه X ، دنباله هدف Y شناسایی شد."

نقش آزمایشگاه

الف) شناسایی و آنالیز محصولات تراریخته

ب) اعتبارسنجی و کنترل کیفیت

- کنترل کیفیت : شامل استفاده از نمونه‌های کنترل مثبت و منفی و رعایت استانداردهای بین‌المللی است.

- اعتبارسنجی روش‌ها: روش‌های آزمایشی باید به طور منظم اعتبارسنجی می‌شوند تا اطمینان حاصل شود که نتایج قابل اعتماد هستند.



نقش نهادهای نظارتی

تنظیم قوانین : تهیه دستورالعمل‌ها، اجباری کردن برچسب‌گذاری

ارزیابی ریسک : ارزیابی ایمنی، نظارت بلندمدت

نظارت و بازرسی : بازرسی دوره‌ای، نمونه‌برداری و آزمایش

آموزش و آگاهی‌بخشی : آموزش کارشناسان، افزایش آگاهی عمومی

