**مجله علوم و صنایع غذایی ایران**

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

# بررسی حضور ژن تراریخته *CaMV35S* در شیر خشک و غذای کودک موجود در تهران با تکنیک Real-time PCR

**رامین بهشتی زاده[۱]، شیلا صفاییان[۲*]، الهام مسلمی[۳]، رضوان موسوی ندوشن[۲]، کسری اصفهانی[۴]**

۱-دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳-استادیار گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴-استادیار، گروه زیست فرآورده های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

**اطلاعات مقاله**

**تاریخ های مقاله :**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱ /۰۷/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸

**کلمات کلیدی:**

ردیابی،

شیر خشک،

تراریخته،

Real-Time PCR

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9

* مسئول مکاتبات:

shila2462462@yahoo.co.in

**چکیده**

**ذرت و سویا بیشترین سطح کشت تراریختگی را در دنیا به خود اختصاص داده اند. با توجه به افزایش واردات سویا و ذرت به ایران و همچنین به دلیل استفاده از روغن های محصولات استراتژی در شیر خشک و غذای کودک، لذا ردیابی تراریختگی در مواد غذایی فرآوری شده با تکنیک Real-time PCR یک نیاز اساسی می باشد. ابتدا ۴۰ نمونه غذای کودک و شیر خشک از داروخانه ها و سوپر مارکت های شهر تهران جمع آوری شد. همه نمونه با استفاده از کیت DNA آزما اکسیر پژوه استخراج شدند و بررسی کمی غلظت اسید نوکلئیک با دستگاه نانودراپ انجام شد. سپس برای بررسی کیفی استخراج DNA انجام شده، تست PCRژن های کنترل داخلی برای سویا (*Lectin*) و ذرت(*Zein*) گذاشته شدند. سپس با تکنیک Real-time PCR حضور ژن تراریخته *CaMV35S* بررسی گردید و نتایج به دست آمده از حضور ژن تراریخته در ۲,۵ ٪ نمونه غذای کودک و ۱۰٪ نمونه در شیر خشک را نشان دادند. بنابراین در این مقاله میزان نفوذ ژن تراریخته در غذای کودک و شیر خشک مورد بررسی قرار گرفته است.**



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-18 ]

[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9 ]

[ DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167 ]

## ۱-مقدمه

با افزایش جمعیت و نیاز بیشتر به مواد غذایی، تامین امنیت غذایی و آگاهی از اجزای محصولات غذایی به یکی از نکته های چالش بر انگیز در سراسر دنیا تبدیل شده است.باظهور تکنولوژیهای نوین زیست فناوری، افزایش کیفیت، زمان نگهداری و همچنین تولید گیاهان مقاوم به آفات و تنش های محیطی از طریق تولید گیاهان GMO[1] صورت می گیرد [۱]. شیر خشک نوزاد، مایعات یا پودرهای بازسازی شده مغذی برای نوزادان و کودکان خردسال هستند که به عنوان جایگزین برای شیر انسان کار می کنند. شیر خشک نقش مهمی در رژیم غذایی نوزادان دارند، زیرا آنها تنها منبع مواد مغذی برای برخی از نوزادان هستند[۲].

شیر خشک عمدتا از لاکتوز، کورن مالتو دکسترین، مواد معدنی هیدرولیز شده و پروتئین تشکیل شده است. چربی های شیر خشک شامل اولئین پالم، روغن سویا، روغن ذرت و روغن آفتابگردان است [۳]. ذرت پرمصرفترین غله دنیا به حساب می آید و از لحاظ مقدار تولید، پس از سویا و گندم در مقام سوم قرار می گیرد. ذرت مورد استفاده در صنایع غذاییمکن است برای مقاومت به علف کش و بیان یک پروتئین از باکتری *Bacillus thuringiensis* که ضد آفات خاصی عمل می کند اصلاح ژنتیکی شده باشد. حدود ۸۰ درصد از سویا کشت شده در دنیا اصلاح شده ی ژنتیکی است [٤]. سویا پرچم دار محصولات تراریخته است و با ٤٧٪ از اراضی زیر کشت محصولات تراریخته، رتبه اول را در بین گیاهان زراعی حاصل از زیست فناوری نوین به خود اختصاص می دهد. تشخیص براساس DNA دارای دقت و حساسیت بسیار زیادی است و قابل کمّیسازی نیز است[۵]. پیشبر CaMV35S از ویروس موزاییک گل کلم، یک از پرکاربردترین پیشبر استفاده شده گیاهان تراریخته است و همچنین با توجه به اینکه این ژن در اکثر محصولات تراریخته تجاری وجود دارد، یکی از مهمترین گزینه ها برای تشخیص محصولات تراریخت زراعی می باشد[۳].

گرچه برچسبدار کردن محصولات تراریخته، توسط بسیاری از کشورها اجباری نیست، اما اکثر کشورهای مصرف کننده و تولید کننده محصولات تراریخت بر أساس از قوانین ملی و بین المللی،آزمایش های کیفی و کمی تشخیص محصولات اصلاح شده ژنتیکی را انجام می دهند[۲].

معمولترین روشهای تشخیصGMO براساس DNA، روش PCR است ک هبا مقادیر اندک نیز قابل ردیابی است. در تکنیکReal-time PCR امکان سنجش کمی میزان محصولات تغییر ژنتیکی در نمونه های مورد بررسی نیز وجود دارد[٦].

در مطالعه حاضرحضور پیشبر CaMV35S در شیر خشک ها و غذهای کودک موجود در داروخانه های استان تهران با تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

## ۲-مواد و روش ها

### ۲-۱-استخراج DNA ژنومی و بررسی کیفیت آن

ابتدا ٤٠ نمونه (۲۰ عدد شیر خشک، ۲۰ عدد غذای کودک) از داروخانه های شهر تهران تهیه شد. سپس استخراج DNA ژنومی با کیت استخراج DNA (آزما اکسیر پژوه) انجام شد. همچنینMon810[2] CRM به عنوان کنترل از کمپانی یورفین تهیه شد. مقدار و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific) ساخت آمریکا در طول موج ۲٦۰ و ۲۸۰ سنجیده شد[۷].

### ۲-۲-پرایمر های مورد استفاده

پرایمر های مورد استفاده برای پیشبر CaMV35S، ژن کنترل داخلی سویا ( *Lectin* ) و ژن کنترل داخلی ذرت ( *Zein* ) می باشند. پس از بررسی توالی های مورد نظر در سایت NCBI، پرایمر ها توسط برنامه Primer Expressطراحی و صحت آنها توسط نرم افزارهای Gene Runner وBLSTN بررسی قرار شد [۷]. در جدول ۱ زیر توالی پرایمر های مورد استفاده مشاهده می گردد.

1. Genetically Modified Organism

2. Certified Reference Materials



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167 ]

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-18 ]

[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9 ]

[ DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167 ]

**Table 1** Oligonucleotide Primers Used in Real-time PCR

| Target gene | Primer | Sequence (5'-3') | Product size (bp) | Reference |
|---|---|---|---|---|
| *Lectin*(Soy) | Lectin-F<br>Lectin-R | GACGCTATTGTGACCTCCTC<br>GAAAGTGTCAAGCTTAACAGCGACG | 110 bp | [3] |
| CaMV35S | F<br>R | GCTCCTACAAATGCCATCA<br>GATAGTGGGATTGTGCGTCA | 195 bp | [3] |
| *Zein*(Maize) | F<br>R | AGTGCGACCCATATTCCAG<br>GACATTGTGGCATCATCATTT | 139 bp | [3] |

## ۲-۳-Real-time PCR

واکنشPCR بر روی نمونه های (CRM5, 1, 0.1) درصد تراریختی و همچنین برای توالی های ژن لکتین ( کنترل داخلی سویا)، زین ( کنترل داخلی ذرت) و CaMV35S در دستگاه StepOne (ABI) انجام شد. اجزا واکنش شامل: 10µl مسترمیکس، 0.5µl پرایمر های (FوR)، 1µl از DNA نمونه ها و آب 8.5µl اضافه شد و به حجم 20µl رسید. واکنش در دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و دمای اتصال ۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه و همچنین در دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه با ۳۰ تکرار اجرا شد. واکنش ها با سه بار تکرار انجام شد. از نمونه CRM به عنوان کنترل مثبت برای CaMV35S و کنترل داخلی ها (*Zein*, *Lectin*) برای ردیابی ذرت و سویا استفاده شد. همچنین از آب بدون DNA به عنوان کنترل منفی، برای تایید عدم آلودگی استفاده شد[۵].

# ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱-نتیجه استخراج

به وسیله نانودراپ کیفیت DNA استخراج شده بررسی شد. غلظت تمام نمونه ها در محدوده116 تا 190 نانوگرم DNA در هر میکرولیتر و نسبت جذب نمونه های استخراج شده ما بین ۲- ۱,۷ بود[۸].

## ۳-۲-نتایجReal-time PCR و بحث روی نتایج به دست آمده

در شیر خشک و غذای کودک موادی از قبیل ذرت و سویا وجود دارد. به کارگیری پروتکل مناسب جهت ارزیابی دقیق تراریختگی این محصولات از اهمیتی زیادی برخوردار می باشد.همان طور که در شکل(۱) مشاهده می شود منحنی ذوب برای ژن کنترل داخلی ذرت به خوبی تکثیر شده است، که نشان دهنده وجود ذرت در همه نمونه ها می باشد. همچنین در شکل شماره (۲) هم ژن کنترل داخلی سویا تکثیر شده است.تکثیر ژن کنترل داخلی سویا و ذرت (*Lectin*وZein) درتمامی نمونه های استخراج شده شیر خشک و غذای کودک دلیلی بر استخراج درست و وجود سویا و ذرت در نمونه ها می باشد[۱۱].

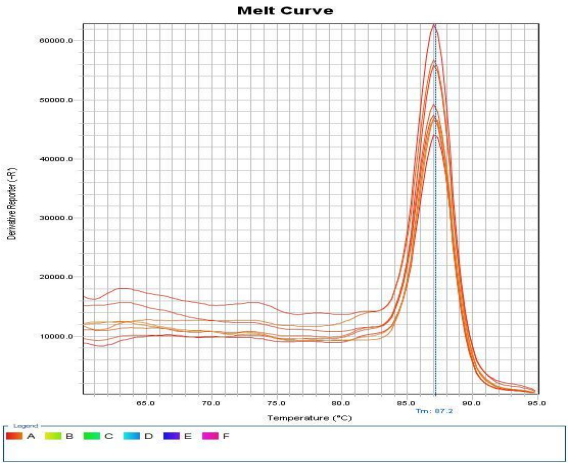


**Fig 1** Melt curves of Zein showed specific PCR product

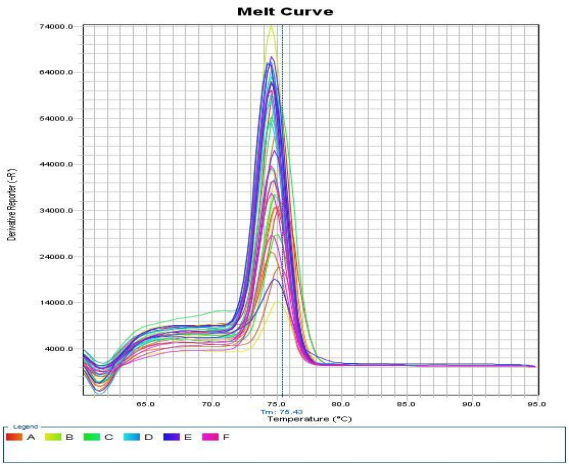


**Fig 2** Melt curves of lectin showed specific PCR product

به منظور تولید ذرت های تراریخته از عناصری مانند:NOS،CaMV35Sو nptII به طور گسترده ای استفاده شده است که در این تحقیق توالی پیشبر CaMV 35S مورد بررسی قرار گرفت [۹]. منشاء این توالی ویـروس موزاییـک گـل کلم بوده و در اکثر محصولات تراریخت تجاری وجود دارد، به همین دلیل یکی از مهم ترین گزینه ها برای غربالگری محصولات تراریخته می باشد[۹]. در پژوهشی برای بررسی وضعیت تراریختگی دانه های برنج، از پرایمر های اختصاصی برای CaMV 35S استفاده شده است[۱۲].

در این تحقیق وجود سویا و ذرت فرآوری شده تراریختهدر تعداد محدودی نمونه مشاهده شد. نتایج به دست آمده قبلی حاکی از درصد بالای سویا و ذرت وارداتی تراریخته می باشد [۱۱]. در تحقیق دیگر در موزامبیک، در ۲۲ نمونه از ٤٧ نمونه توالی CaMV35Sو Nos ردیابی شد. در حالی که در این تحقیق ۲ نمونه از غذایی کودک و 3نمونه از شیر خشک پیشبرCaMV35Sردیابی شد[١٤].

همچنین حضـور ذرت هـای تراریخته در غذاهای فرآوری شده که به طورتجـاری در ایـران عرضه می شود به وسیله ی آغازگرCaMV35Sتایید است [۱۲]. بارا و همکاران در سال 2020 ،کماکان دو توالیCaMV35Sو Nos terminatorرا از مهم ترین عناصر موجود در رخداد های تراریخته گزارش کردند. [١٤].

نتایج تست Real-time PCRبرای نمونه هایی که توالی CaMV 35S در آنها ردیابی شده همچنین Ct نمونه های ردیابی شده در جدول شماره 2 نشان داده شده است.

**Table 2.**DNA Concentration and Real-time PCR of Samples

| sample | DNA concentration (ng/ µl) | *CaMV 35S*geneCT values |
|---|---|---|
| Infant formula | 180.5 | 29.48 |
| Infant formula | 176.8 | 30.70 |
| Infant formula | 165.8 | 31.92 |
| Baby food | 134.9 | 29.95 |
| Baby food | 190.7 | 30.36 |

در شکل شماره (۳) منحنی ذوب برای توالیCaMV35S در ۳ نمونه شیر خشک و ۲ نمونه غذایی کودک مشاهده می شود.

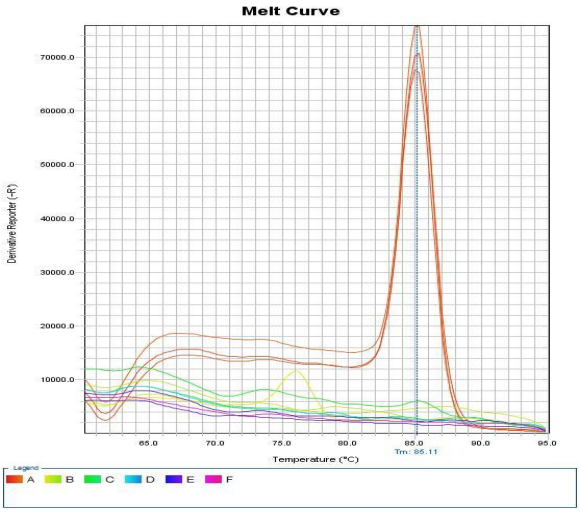


**Fig 3** Melt curves of CaMV35S

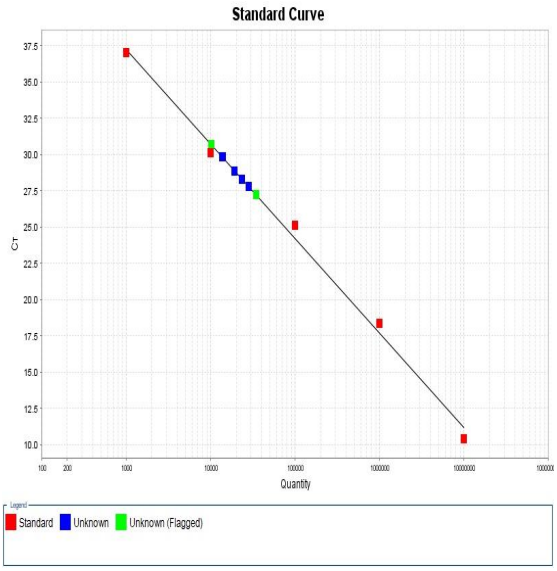


**Fig 4** Standard curve for CaMV35S

در نمودار استاندارد محور عمودی(Ct) و محور افقی کمیت را نشان می دهد. همان طور که در شکل شماره (٤) مشاهده می شود، برای تعیین حساسیت تست مقدار۱۰۰۰ کپی نامبر قابل شناسایی بوده، در حالی که در تحقیقی مشابه حداقل ۱۰۰۰۰ کپی نامبر را ردیابی کردند [۱۱] همچنین در منحنی استاندارد، فاکتورهای بررسی Ct نشان میدهد که این مقداربا غلظت رابطه عکس دارد و با کاهش غلظت مقدار Ct افزایش یافته است.در پژوهشی دیگر که Cottenet در سال ۲۰۱۹ با تکنیک مولتی پلکس Real-time PCR انجام دادند قادر به شناسایی ۲۰ کپی نامبر شدند در حالی که در این پژوهش ۱۰۰۰ کپی نامبر قابل شناسایی بود[۱۷].



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167 ]

**Table 3** Identification of CaMV35S, Lectin, Zein Sequences by Real-time PCR in Baby food and Infant Formula

| Sample type | Number of samples | CaMV35S positive | Endogenous gene | Endogenous gene | Negative |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Lectin* | Zein | |
| Baby food (Iranian) | 10 | 0 | 10 | 10 | 10 |
| Baby food (imported) | 10 | 2 | 10 | 10 | 8 |
| Infant formula (Iranian) | 10 | 1 | 10 | 10 | 9 |
| Infant formula (imported) | 10 | 2 | 10 | 10 | 8 |
| Total | 40 | 12.5% | 100% | 100% | 87.5% |

همانطور که در جدول شماره ۳ مشاهده می شود در ۱۲,۵ درصد از نمونه های غذای کودک و شیر خشک مورد بررسی توالی CaMV 35S ردیابی شد که از این مقدار ۲ عدد شیر خشک وارداتیو 1 عدد شیر خشک ایرانی می باشند. در تحقیقی مشابه در سال ۲۰۲۰ و با استفاده از تکنیک Real-time PCR به وسیله پروب در الجزایر روی نمونه های غذایی کودک، وجود محصولات تراریخته تشخیص داده نشد[۱۶].

## ٤- نتیجه گیری

نتایج این مطالعه ردیابی توالیCaMV35Sرا در ۱۲,۵ ٪ شیر خشک و غذای کودک موجود در بازار شهر تهران را نشان می دهد. با توجه به قوانین موجود در رابطه با استفاده از محصولات تراریخته، لزوم برچسپ گذاری بر روی محصولات مذکور و بررسی این محصولات توسط نهاد های نظارتی پیشنهاد می شود.

## ٥-منابع


[1] Chawla, H., 2011. Introduction to plant biotechnology (3/e). CRC Press.

[2] Hediger, M.L., Overpeck, M.D., Ruan, W.J. and Troendle, J.F., 2000. Early infant feeding and growth status of US-born infants and children aged 4–71 mo: analyses from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *The American journal of clinical nutrition*, *72*(1), pp.159-167.

[3] Pickett-Bernard, D., 2006. Infant Formula: Evaluating the Safety of New Ingredients. Journal of Human Lactation, 22(2), pp.231-232.

[4] Berdichevets, I.N., Shimshilashvili, H.R., Gerasymenko, I.M., Sindarovska, Y.R., Sheludko, Y.V. and Goldenkova-Pavlova, I.V., 2010. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants. Analytical and bioanalytical chemistry, 397(6), pp.2289-2293.

[5] Arun, Ö.Ö., Yılmaz, F. and Muratoğlu, K., 2013. PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. Food Control, 32(2), pp.525-531.

[6] 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(3), pp.369-384.

[7] Gryson, N., 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. Analytical and Bioanalytical chemistry, 396(6), pp.2003-2022.

[8] Zhang, Q., Maroof, M.S., Lu, T.Y. and Shen, B.Z., 1992. Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, *83*(4), pp.495-499.

[9] Ahmed, F.E., 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. TRENDS in Biotechnology, 20(5), pp.215-223.




[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167 ]

[10] Vráblík, A., Hodek, J., Demnerová, K., Soukup, J. and Ovesná, J., 2012. Development and verification of PCR based assay to dectect and quantify garden pea lec gene. Czech Journal of Food Sciences, 30(3), pp.247-257.

[11] Safaei, P., Rezaie, S., Alimohammadi, M., Agha Kuchak Afshari, S., Mehdizadeh, M. and Molaee Aghaee, E., 2020. Qualitative PCR-based detection of genetically modified soy and maize products in Iran. *International Journal of Food Properties*, *23*(1), pp.459-469.

[12] Ashrafi-Dehkordi E, Maghsoudi K, Babajafari S, Mazloomi M. Investigation on transgenic rice status in Shiraz consumer market using PCR. Genetic Engineering and Biosafety Journal. 2020; 9 (2) :204-212

[13] Ashrafi-Dehkordi, E., Mazloomi, S.M. and Hemmati, F., 2021. A comparison of DNA extraction methods and PCR-based detection of GMO in textured soy protein. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, *16*(1), pp.51-57.

[14] Joelma, L.B., Olvia, C.P., Amlia, M.M., Artimsia, M.M., Lucinda, D.A., Lus, D.N. and Dcia, C., 2022. Detection of genetically modified organisms in food products commercialized in Mozambique. *African Journal of Food Science*, *16*(2), pp.22-29.

[15] 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: IJPR*, *12*(1), p.25.

[16] Brara, Z., Costa, J., Villa, C., Grazina, L., Bitam, A. and Mafra, I., 2020. Surveying genetically modified maize in foods marketed in Algeria. *Food Control*, *109*, p.106928.

[17] Cottenet, G., Blancpain, C., Sonnard, V. and Chuah, P.F., 2019. Two FAST multiplex real-time PCR reactions to assess the presence of genetically modified organisms in food. *Food chemistry*, *274*, pp.760-765.

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-18 ]
[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9 ]
[ DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167 ]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-18 ]

[ DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9 ]

[ DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167 ]

# Investigation of the CaMV35SPromoter sequence in baby food and infant formula in the city of Tehran by Real-time PCR technique

**Beheshti zadeh, R. [1], Safaeian, Sh. [2*], Moslemi, E. [3], Mosavi nadoshen, R.[2] , Esfahani, K. [4]**

1. Department of Food science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
2. Department of Food science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
3. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Department of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology (IAB), National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

## ARTICLE INFO

**Article History:**

Received 2022/ 10/ 03
Accepted 2023/ 01/ 28

**Keywords:**

GMO,
Detection,
Real-time PCR,
GMO,
Infant formula,
CaMV35S

**DOI: 10.22034/FSCT.19.133.167**
**DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.14.9**

*Corresponding Author E-Mail:
shila2462462@yahoo.co.in

## ABSTRACT

Corn and soybeans have the largest area of GM crops in the world. Milk powder and baby food are processed foods that contain corn and soybeans,therefore, monitoring transgenic corn and soy in processed food has been investigated in several studies.In this study, 40 samples of baby food and milk powder were collected from pharmacies and supermarkets in Tehran. All the samples were extracted using Azmaelixir DNA kit. Internal control genes for soy (Lectin) and corn (Zein) were checked to ensure the extraction. Then, the presence of CaMV35Stransgenic Promoter was checked by Real-time PCR technique. The results showed the presence of this sequence in 2.5% of baby food samples and 10% of samples in infant formula. The preliminary results of this study suggest more investigation and monitoring is necessary for the possible labeling of these products.