

Efficiency of PCR and Nanobiosensor Methods for Detection of Transplastomic Tobacco Plant

Karimi F.* *PhD*, Khodaie E.¹ *MSc*

*Biology Department, Sciences Faculty, Maragheh University, Maragheh, Iran

¹Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

Abstract

Aims: In recent years, according to the benefits of chloroplast transformation, the cultivation of transplastomic plants and their products has been increased. Due to their biosafety concerns, their identification and labeling have become more widely considered. The aim of this study was to present an optimal method based on polymerase chain reaction (PCR) and nanobiosensor for detection of transplastomic tobacco plants and compare their sensitivity.

Materials & Methods: In the present experimental research, *aadA* gene as a chloroplast selectable marker was considered to design specific primer and probe. In PCR method, after optimization of *aadA* gene amplification, its sensitivity was evaluated with different percentages of transplastomic DNA. In nanobiosensor method at first, the labeled *aadA* probe was immobilized on graphene oxide (GO) and, then, hybridization reaction was optimized to identify target DNA sequence.

Findings: The amplification of 800 bp DNA related to *aadA* gene was observed. The PCR reaction allowed up to 5% DNA transplastomic tobacco to reproduce the *aadA* gene. In results of nanobiosensor after immobilization of *aadA* probe on GO, fluorescence emission was quenched and by adding the transplastomic tobacco, DNA was observed again. In this method, up to 1% transplastomic tobacco DNA, fluorescence emission was significant in comparison with control tobacco plant.

Conclusion: The PCR method can detect a transplastomic tobacco plant with 5% DNA sensitivity and detect biomarker sensitivity with 1% DNA sensitivity. The PCR method can detect a transplastomic tobacco plant with 5% DNA sensitivity and nanobiosensor can detect with 1% DNA sensitivity. Therefore, nanobiosensor method is not only a reliable diagnostic method, in addition to the PCR method for detecting transplastomic plants, but also has a higher sensitivity.

Keywords

Transgenic Plants [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/D030821>];

Biosensor [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68015374>];

Tobacco [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68014026>];

Polymerase Chain Reaction [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016133>]

*Corresponding Author

Tel: +98 (41) 37252339

Fax: +98 (41) 37276060

Post Address: Maragheh University, Daneshgah Street, Madar Square, Amir Kabir Highway, Maragheh, Iran. Postal Code: 55181883111

karimifm@maragheh.ac.ir

Received: August 30, 2016

Accepted: November 23, 2017

ePublished: June 21, 2018

کارایی روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نانوحسگر زیستی در شناسایی گیاه ترانس‌پلاستوم توتون

فرخ کریمی* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

المیرا خدایی MSc

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

چکیده

اهداف: در سال‌های اخیر با توجه به مزایای تراریختی کلروپلاستی، سطح زیر کشت این گیاهان و محصولات ناشی از آنها افزایش یافته و به دلیل نگرانی‌های احتمالی ایمنی‌زیستی آنها شناسایی و برچسب‌گذاری آنها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. هدف پژوهش حاضر طراحی و ارایه یک روش بهینه بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و نانوحسگر زیستی برای شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم و مقایسه حساسیت آنها بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر برای طراحی آغازگرها و کاوشگرهای اختصاصی، نشانگر *aada* کلروپلاستی به کار رفت. در روش PCR بعد از بهینه‌سازی شرایط تکثیر ژن *aada*، حساسیت آن با درصدهای مختلف DNA گیاه ترانس‌پلاستوم توتون مورد بررسی قرار گرفت. در روش نانوحسگر زیستی ابتدا کاوشگر نشان‌دار ژن *aada* در صفحات گرافن اکسید تثبیت، سپس واکنش هیبریداسیون برای شناسایی توالی هدف بهینه‌سازی و حساسیت آن با درصدهای مختلف DNA گیاه ترانس‌پلاستوم تعیین شد.

یافته‌ها: تکثیر باند ۸۰۰ جفت‌بازی ژن *aada* در گیاهان ترانس‌پلاستوم توتون مشاهده شد. واکنش PCR توانست تا ۵٪ DNA توتون ترانس‌پلاستوم، ژن *aada* را تکثیر نماید. با تثبیت کاوشگر *aada* در سطح گرافن اکسید فلورسانس نشری خاموش و با اضافه‌کردن DNA گیاه ترانس‌پلاستوم توتون دوباره نشر فلورسانس ظاهر شد. در بررسی حساسیت این روش تا ۱٪ DNA گیاه ترانس‌پلاستوم نشر فلورسانس به‌طور معنی‌دار بیشتر از گیاه شاهد مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** روش PCR می‌تواند گیاه ترانس‌پلاستوم توتون را با حساسیت ۵٪ DNA و روش حسگر زیستی با حساسیت ۱٪ DNA شناسایی نماید. بنابراین روش حسگر زیستی نه تنها یک روش تشخیصی مطمئن در کنار روش PCR برای شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم است، بلکه حساسیت بالاتری نیز دارد.

کلیدواژه‌ها: گیاهان ترانس‌پلاستوم، نانوحسگر زیستی، توتون، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۲

* نویسنده مسئول: karimifm@maragheh.ac.ir

مقدمه

به‌کارگیری زیست‌فناوری مولکولی در افزایش کارایی و عملکرد گیاهان، فرصت‌ها و چالش‌های جدیدی را در توسعه محصولات کشاورزی و امنیت غذایی بشر ایجاد کرده است [1]. تغییر ژنتیکی سلول‌های گیاهی با استفاده از فناوری DNA نوترکیب، فنون مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌ها از منابع ژنتیکی مختلف به سلول‌های گیاهی منجر به توسعه روزافزون محصولات کشاورزی اصلاح‌شده ژنتیکی شده است [2, 3]. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان و نیاز غذایی بیشتر، این امر با افزایش بازدهی تولید و ارتقای ارزش تغذیه‌ای محصولات کشاورزی نقش حایز اهمیتی در تامین امنیت غذایی جهان دارد [4]. افزایش سطح زیر کشت گیاهان اصلاح‌شده ژنتیکی در جهان از ۲ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ به بیش از ۱۸۱ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۴، روند پیشرفت و فراگیری این نوع محصولات را به‌خوبی نمایان می‌سازد [4].

گیاهان تغییریافته ژنتیکی شامل گیاهان تراریخت هسته‌ای و تراریخت کلروپلاستی هستند. با توجه به مزایای تراریختی

کلروپلاستی انتظار می‌رود که روند تولید این گیاهان در دهه اخیر براساس آمار سازمان جهانی، سرعت قابل توجهی پیدا کند [5, 6]. با وجود مزایای محصولات اصلاح‌شده ژنتیکی، ورود آنها در زنجیره غذایی انسان، با توجه به نگرانی‌های موجود در ارتباط با خطرات بالقوه ناشی از تولید و مصرف این گونه مواد، پرسش‌های متعددی را در زمینه احتمال بروز عوارض نامطلوب مانند حساسیت، افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، اثرات مخرب محیطی و انتقال افقی ژن‌ها در جامعه مطرح کرده است [7, 8]. به دلیل اهمیت این موضوع، در طول دو دهه گذشته کمیته‌های بین‌المللی مسئولیت‌های قانون‌گذاری و تعیین سیاست‌های لازم برای تضمین ایمنی محصولات اصلاح‌شده ژنتیکی را به عهده گرفته و در این راستا راهبردها و دستورالعمل‌های متعددی مطرح شده است [9]. پروتکل‌های جهانی ایمنی زیستی کارتاها از جمله این موارد است. براساس این قوانین برآورد ایمنی این گونه محصولات مبتنی بر اثبات برابری همه‌جانبه آنها با انواع اصلاح‌شده و همچنین انجام آزمون‌های اختصاصی در زمینه حساسیت‌زایی، سمیت متابولیت‌ها و ماده غذایی است [1, 11, 12]. اهمیت این موضوع از این حیث است که همه محصولات وارداتی به کشورها از مبادی گمرکی وارد نشده و کنترل نمی‌شوند، بنابراین باید تراریخته‌بودن یا نبودن آنها به‌خصوص فرآورده‌های موجود در بازار مصرف مورد ارزیابی قرار گیرد [13]. این اطمینان زمانی به دست می‌آید که این محصولات از مبدا جدا شده یا برچسب‌زنی در مورد آنها انجام شود تا بدین وسیله اثر آنها بر محیط زیست و سلامت عمومی کاملاً مورد بررسی قرار گیرد [11, 12, 14-16]. بنابراین ارایه یک روش کارآ و ایده‌آل بر پایه روش‌های زیست‌مولکولی یا نانوفناوری زیستی برای شناسایی آنها حایز اهمیت است. روش رایج برای گیاهان تراریخت کلروپلاستی استفاده از روش‌های ایمنولوژیکی و زیست‌مولکولی است. در سال‌های اخیر از روش‌های زیست‌مولکولی شامل روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای ردیابی و شناسایی گیاهان تراریخت استفاده شده است [17-20]. در روش‌های مبتنی بر PCR با طراحی آغازگرهای اختصاصی بر توالی‌های مربوط به DNA گیاهان ترانس‌پلاستوم می‌توان این گیاهان و محصولات حاصل از آنها را در مواد غذایی شناسایی کرد [19]. طی دهه اخیر گسترش فناوری نانو در کنار روش‌های مبتنی بر PCR، برای بررسی ماکرومولکول‌های زیستی مورد توجه قرار گرفته است. حسگرهای زیستی ابزارهایی هستند که می‌توانند برای ردیابی مولکول‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرند. در سال‌های اخیر از این ابزارها برای بررسی محصولات تراریخت استفاده شده است [21].

هدف پژوهش حاضر طراحی و ارایه یک روش بهینه بر پایه PCR و نانوحسگر زیستی برای شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم و مقایسه حساسیت آنها بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر بذور گیاه ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم توتون (*Nicotiana tabacum*) رقم سامسون (Samsun) از پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شدند. سپس به‌منظور تولید گیاهچه‌ها بعد از ضدعفونی با اتانول ۷۰٪ در محیط موراشیگ و اسکوگ حاوی آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین کشت داده شدند.

بعد از ۶ الی ۷ هفته استخراج DNA، آنالیزهای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نانوحسگر زیستی روی گیاهچه‌های رشدکرده انجام شد.

دستگاه فلوریمتر خوانده شد. بعد از تایید تثبیت کاوشگر در سطح صفحات گرافن اکسید، نانوحسگر زیستی آماده‌سازی شده در واکنش هیبریداسیون برای شناسایی توالی هدف مورد استفاده قرار گرفت. بهینه‌سازی واکنش هیبریداسیون، ابتدا با توالی مکمل سنتتیک انجام شد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از توالی مکمل (۱۰ پیکومول) با ۱۰ میکرولیتر از توالی نانوحسگر در بافر تریس با حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با دور ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس نشر نوری آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت در واکنش هیبریداسیون DNA گیاه ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم به‌عنوان DNA هدف مورد استفاده قرار گرفتند.

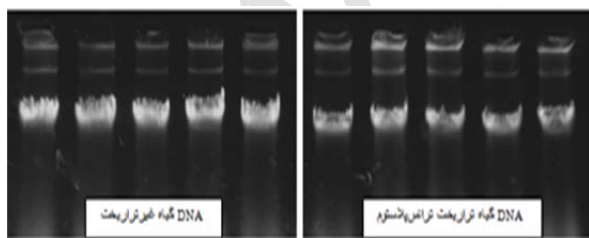
بعد از تایید کاوشگر اختصاصی مربوط به ژن *aada* که با رنگ فلورسنس‌زای فلورسین‌آمیدیت (FAM) نشان‌دار شده بود در سطح گرافن اکسید به روش غیرکووالان تثبیت شد.

تعیین حساسیت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نانوحسگر زیستی در شناسایی گیاه ترانس‌پلاستوم توتون: برای تعیین حساسیت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نانوحسگر زیستی ابتدا درصدهای مختلفی از DNA گیاهان ترانس‌پلاستوم توتون تهیه شد. سپس عملکرد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نانوحسگر زیستی بررسی شد. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر توالی مربوط به ژن *aada* در درصدهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی حساسیت روش نانوحسگر زیستی واکنش هیبریداسیون نانوحسگر بر پایه گرافن اکسید با درصدهای مختلف DNA گیاه ترانس‌پلاستوم توتون انجام و میزان نشر فلورسنس در طول موج ۵۱۲ نانومتر بررسی شد. تمامی آزمایش‌ها در تعیین حساسیت نانوحسگر زیستی با سه تکرار صورت پذیرفت.

تفاوت‌های آماری مربوط به نشر فلورسنس نمونه‌های ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم توتون با آزمون T-استیودنت با سطوح احتمال $p < 0.05$ و $p < 0.01$ و آنالیز نمونه‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج الکتروفورز ژل آگاروز کیفیت DNA کل ژنومی استخراج‌شده از گیاهان ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم را تایید نمود (شکل ۱).



شکل ۱) الگوی الکتروفورز مربوط به DNA استخراج‌شده از گیاه ترانس‌پلاستوم توتون و شاهد

با تایید DNA ژنومی استخراج‌شده، ابتدا ترانس‌پلاستوم بودن گیاهان با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تایید شد و الگوی الکتروفورز نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تکثیر باند ۸۰۰ جفت‌بازی مربوط به ژن *aada* را در DNA مربوط به گیاهان ترانس‌پلاستوم نشان داد، در حالی که در گیاهان غیرترانس‌پلاستوم هیچ بانده مشاهده نشد (شکل ۲).

توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی و آغازگرها: توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی و آغازگرها برای توالی اختصاصی مربوط به ژن *aada* با استفاده از برنامه الیگو طراحی و اختصاصی بودن آنها به‌وسیله نرم‌افزار BLAST بررسی شد. کلیه توالی‌های طراحی‌شده توسط شرکت Bioneer کره‌جنوبی سنتز شدند و در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و طراحی حسگر زیستی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱) توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR و حسگر زیستی

نوع توالی	نام پرایمر	توالی	دمای اتصال	طول باند تکثیریافته
آغازگر	aadA F	5'-GGATCCATGGCTGTGAAGCGGT-3'	۵۷°C	۸۰۰ جفت‌باز
آغازگر	aadA R	5'-CCCTCCCTTTATTGGCAACTAC-3'	۵۷°C	۸۰۰ جفت‌باز
کاوشگر	aadAP	5'-TGACGGGTGTGATACGGGC-3'	۶۰°C	-
توالی مکمل کاوشگر	aadAT	5'-GCCAGTATCAGCCGTC-3'	۶۰°C	-

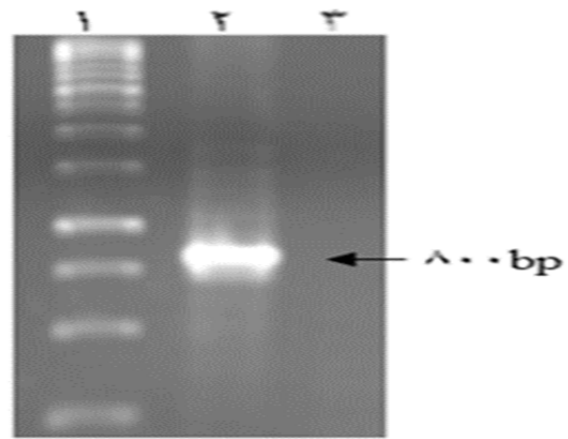
استخراج DNA از گیاهان ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم: به‌منظور استخراج DNA کل از گیاهان ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم، ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه بافت برگ گیاهی، با استفاده از ازت مایع به حالت پودری تبدیل شد. سپس DNA کل با استفاده از روش ارایه‌شده در پروتکل کیت استخراج DNA گیاهی (INtron Biotechnology؛ کره جنوبی) استخراج شد. در نهایت DNA استخراج‌شده با روش‌های اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ از نظر کمی و کیفی تایید شد.

بعد از استخراج DNA کل ژنومی از گیاهان ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم، ابتدا DNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و اسپکتروفتومتری از لحاظ کمی و کیفی تایید شد.

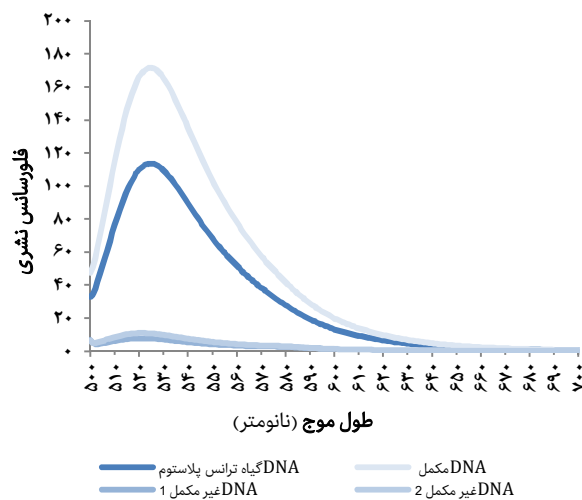
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم: در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم توتون از غیرترانس‌پلاستوم از توالی‌های اختصاصی مربوط به ژن *aada* استفاده شد. واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن *aada* برای تکثیر توالی اختصاصی آن صورت پذیرفت. سپس DNA استخراج‌شده از گیاهان ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم بعد از تایید کمی و کیفی به‌عنوان DNA الگو در واکنش PCR به کار رفتند.

طراحی نانوحسگر زیستی برای بررسی گیاهان ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم توتون: برای بررسی گیاهان ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم یک حسگر زیستی بر پایه گرافن اکسید طراحی شد. گرافن اکسید براساس پروتکل روش هامر سنتز می‌شود [22]. بعد از سنتز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و UV-visib آنالیز و تایید آن صورت گرفت. برای نانوحسگر ابتدا توالی کاوشگر نشان‌دار طراحی‌شده برای توالی‌های اختصاصی مربوط به ژن *aada* با استفاده از روش غیرکووالان در سطح صفحات گرافن اکسید تثبیت شد. برای تثبیت، ۱۰ میکرولیتر از توالی کاوشگر ژن (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با ۱۰ میکرولیتر از توالی کاوشگر ژن *aada* (۱۰ پیکومول) در حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر بافر تریس مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس نشر نوری آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر به‌وسیله

نشر نوری آن خاموش شد. با اضافه کردن توالی مکمل کاوشگر و انجام واکنش هیبریداسیون، دوباره نشر فلورسانس ظاهر شد. در واکنش هیبریداسیون برای DNA ژنومی گیاهان ترانس پلاستوم توتون، میانگین نشر فلورسانس با شدت $113/3 \pm 8/69$ مشاهده شد که در مقایسه با گیاهان غیرترانس پلاستوم با میانگین شدت نشر فلورسانس $10/86 \pm 1/24$ ، به طور معنی داری بالاتر بود ($p \leq 0/01$ ؛ نمودار ۲). در نتایج تعیین حساسیت، روش واکنش زنجیره ای پلی مرز و نانوحسگر زیستی با درصدهای مختلفی از DNA گیاهان ترانس پلاستوم، واکنش زنجیره ای پلی مرز توانست تا رقت ۵٪ DNA تراریخت، باند مربوط به ژن *aada* را تکثیر کند (شکل ۴). در نتایج نانوحسگر زیستی، میزان نشر فلورسانس تا غلظت ۱٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم با شدت $19/4$ به طور معنی داری نسبت به گیاه غیرترانس پلاستوم با شدت $10/9$ بالاتر بود ($p \leq 0/05$ ؛ نمودار ۳).

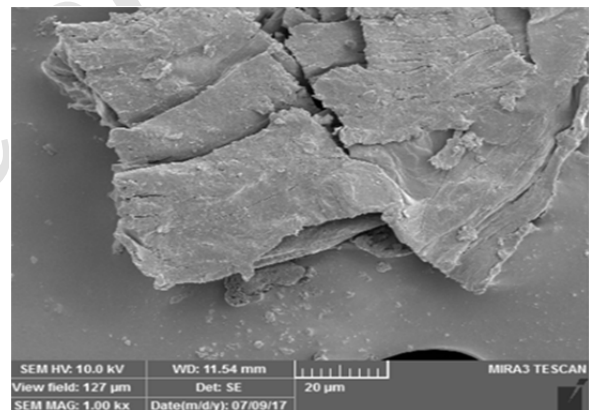


شکل ۲ الگوی الکتروفورز مربوط به نتایج PCR برای تکثیر ژن *aada* (چاهک ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA (یک کیلو جفت باز؛ شرکت فرمنتاز؛ ایالات متحده)
چاهک ۲) DNA کل گیاه ترانس پلاستوم توتون
چاهک ۳) DNA کل گیاه شاهد توتون

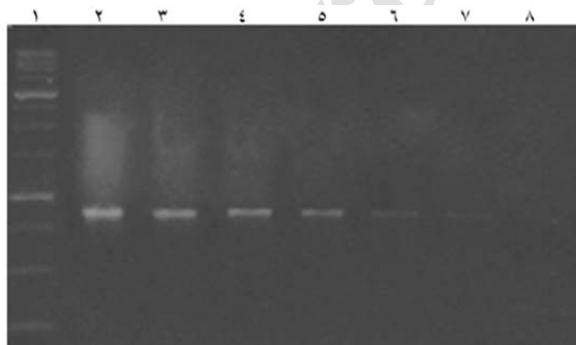


نمودار ۲ شناسایی DNA ترانس پلاستوم توتون با استفاده از نانوحسگر بر پایه گرافن اکسید و کاوشگر ژن *aada* (گرافن اکسید و کاوشگر ژن گزینشگر *aada*)
نشر فلورسانس مربوط به DNA مکمل کاوشگر و DNA مربوط به گیاه ترانس پلاستوم توتون به طور معنی داری بیشتر از DNAهای غیرترانس پلاستوم و غیرمکمل بود که وجود توالی مربوط به ژن *aada* در ژنوم گیاه ترانس پلاستوم را نشان داد

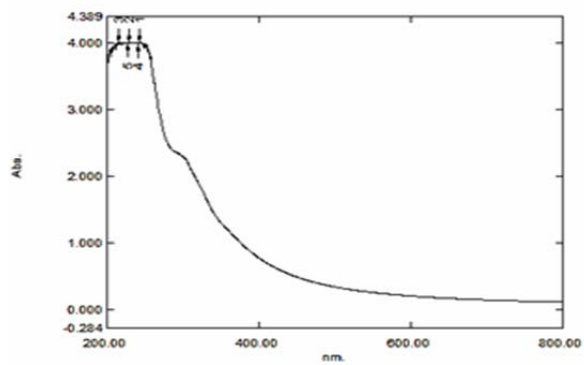
در روش نانوحسگر زیستی ابتدا نانوذره گرافن اکسید سنتز شده با استفاده از روش های UV-vis و میکروسکوپ الکترونی SEM تایید شد. در طیف نور UV، نوار جذبی ظاهر شده در طول موج های ۲۳۰ و ۳۰۰ نانومتر وجود نانوذره گرافن اکسید را تایید کرد (شکل ۳؛ نمودار ۱).



شکل ۳ آنالیز گرافن اکسید سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM



شکل ۴ الگوی الکتروفورز مربوط به نتایج PCR برای تکثیر ژن *aada* با درصدهای مختلف گیاه ترانس پلاستوم توتون
چاهک ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA (یک کیلو جفت باز)
چاهک ۲) تکثیر باند ژن *aada* با ۱۰۰٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم
چاهک ۳) تکثیر باند ژن *aada* با ۷۵٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم
چاهک ۴) تکثیر باند مربوط به ژن *aada* با ۵۰٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم
چاهک ۵) تکثیر باند مربوط به ژن *aada* با ۲۵٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم
چاهک ۶) تکثیر باند مربوط به ژن *aada* با ۱۰٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم
چاهک ۷) تکثیر باند مربوط به ژن *aada* با ۵٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم
چاهک ۸) تکثیر باند مربوط به ژن *aada* با ۱٪ DNA گیاه ترانس پلاستوم



نمودار ۱ آنالیز طیف UV-Vis گرافن اکسید

با تایید نانوذره، کاوشگر مربوط به ژن *aada* در سطح گرافن اکسید تثبیت شد. کاوشگر نشان دار شده با FAM که در طول موج ۵۱۸ نانومتر دارای نشر نوری بود، در اثر تثبیت در سطح گرافن اکسید

نشر فلورسانس دلیلی بر وجود توالی هدف در واکنش هیبریداسیون است [25, 26].

در مطالعه حاضر بعد از بهینه‌سازی واکنش هیبریداسیون، DNA مربوط به گیاه ترانس‌پلاستوم و غیرترانس‌پلاستوم توتون تک‌رشته‌ای شد و در واکنش هیبریداسیون مورد استفاده قرار گرفت. بعد از هیبریداسیون نشر فلورسانس به وسیله دستگاه فلوریمتر خوانده شد. نتایج نشان داد که در واکنش هیبریداسیون DNA گیاهان ترانس‌پلاستوم توتون نشر فلورسانس به طور معنی‌دار نسبت به گیاهان غیرترانس‌پلاستوم بالا بود. علت این پدیده وجود توالی هدف کاوشگر در ژنوم کلروپلاست گیاه ترانس‌پلاستوم توتون است.

در این مطالعه برای تعیین حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز درصد‌های مختلفی از DNA گیاه ترانس‌پلاستوم توتون تهیه شد، سپس تکثیر باند مربوط به ژن *aada* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آن بررسی شد. نتایج نشان داد که واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز می‌تواند تا رقت ۵٪ DNA تراریخت، باند مربوط به ژن *aada* را تکثیر کند. در روش نانوحسگر زیستی نیز واکنش هیبریداسیون نانوحسگر با درصد‌های مختلف DNA گیاه ترانس‌پلاستوم توتون انجام و میزان نشر فلورسانس در دستگاه فلوریمتر خوانده شد. نتایج نشان داد که میزان نشر فلورسانس به طور معنی‌داری تا غلظت ۱٪ نسبت به DNA گیاه غیرترانس‌پلاستوم بالا بود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم وجود دستگاه فلوریمتری در آزمایشگاه اجرای این مطالعه اشاره کرد. بعد از طراحی و انجام آزمایشات، برای سنجش میزان نشر فلورسانس از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استفاده شد که ممکن است در طول مسیر جابجایی نمونه‌ها شرایط محیطی روی آنها تاثیر گذاشته باشد.

پیشنهاد می‌شود نانوحسگرهای الکتروشیمیایی طراحی شوند و عملکرد آنها در شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم مورد مطالعه قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز می‌تواند گیاه ترانس‌پلاستوم توتون را با حساسیت ۵٪ DNA این گیاه و روش نانوحسگر زیستی با حساسیت ۱٪ DNA آن شناسایی کند. بنابراین روش نانوحسگر زیستی نه تنها یک روش تشخیصی مطمئن در کنار واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم است، بلکه حساسیت بالاتری نیز دارد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از آقای دکتر باقر

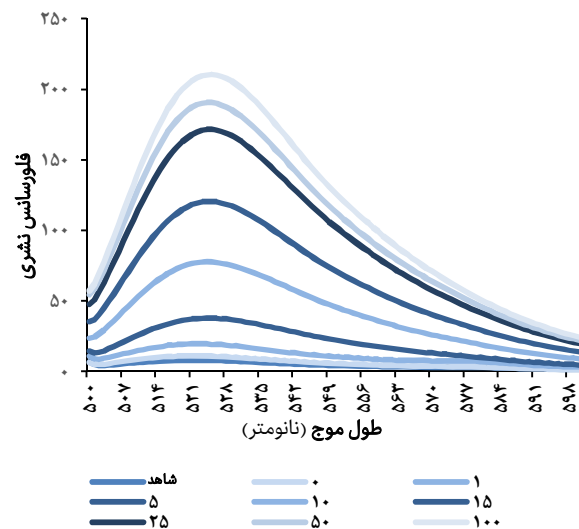
افتخاری‌سیس به خاطر کمک‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی میان نویسندگان وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فرخ کریمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۸۰٪)؛ المیرا خدایی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت سازمان یا نهادی نبوده است.



نمودار ۳) واکنش هیبریداسیون نانوحسگر زیستی بر پایه گرافن اکسید و کاوشگر ژن *aada* با درصد‌های مختلف DNA گیاه ترانس‌پلاستوم توتون برای تعیین حساسیت آن به طور معنی‌داری تا ۱٪ DNA مربوط به گیاه ترانس‌پلاستوم توتون نشر فلورسانس نسبت به DNA غیرترانس‌پلاستوم و غیرمکمل بالا بود ($p < 0.05$)

بحث

هدف پژوهش حاضر طراحی و ارایه یک روش بهینه بر پایه PCR و نانوحسگر زیستی برای شناسایی گیاهان ترانس‌پلاستوم و مقایسه حساسیت آنها بود.

در مطالعه حاضر در نتایج PCR گیاهان ترانس‌پلاستوم در گیاهان ترانس‌پلاستوم باند ۸۰۰ جفت‌بازی مربوط به ژن *aada* حضور داشت، در حالی که در نتایج PCR گیاهان غیرترانس‌پلاستوم هیچ باندهایی مشاهده نشد. ژن *aada* به عنوان نشانگر انتخابی رایج در گزینش گیاهان ترانس‌پلاستوم استفاده می‌شود [22]. توالی کدکننده این ژن به همراه ژن هدف در سطح ناقل کلروپلاستی کلون شده و در فرآیند تراریختی به ژنوم کلروپلاست منتقل می‌شود. در حالت طبیعی در ژنوم هسته‌ای یا کلروپلاست گیاه وجود ندارد. در مطالعه حاضر مشاهده شدن تکثیر باند مربوط به ژن *aada* تاییدکننده وجود توالی این ژن در ژنوم کلروپلاست توتون بود.

در طیف نور UV نوار قوی ظاهر شده در طول موج ۲۳۰ نانومتر به انتقالات $\pi-\pi^*$ و نوار ضعیف ظاهر شده در طول موج ۳۰۰ نانومتر اغلب به انتقالات $n-\pi^*$ گروه‌های کربونیل نسبت داده می‌شود [23, 24].

در مطالعه حاضر کاوشگر در حالت آزاد در طول موج ۵۱۸ نانومتر نشر فلورسانس داشت. در اثر تثبیت کاوشگر در سطح گرافن اکسید نشر فلورسانس آن خاموش شد. دلیل این پدیده مربوط به خواص خاموش‌کنندگی گرافن اکسید بود [23]. در طی واکنش تثبیت مولکول DNA کاوشگر از طریق پیوندهای $\pi-\pi^*$ به سطح گرافن اکسید متصل شده، این اتصال باعث خاموشی نشر فلورسانس FAM با استفاده از گرافن اکسید خاموش می‌شود [25]. در مطالعه حاضر با اضافه شدن توالی مکمل کاوشگر و انجام واکنش هیبریداسیون نشر فلورسانس دوباره ظاهر شد. ظاهر شدن نشر فلورسانس FAM بعد از واکنش هیبریداسیون، به علت اتصال توالی هدف به کاوشگر بود. در اثر هیبرید شدن توالی هدف با کاوشگر، ساختار فضایی DNA عوض شد، از سطح گرافن اکسید جدا و در اثر جدا شدن کاوشگر دوباره نشر نوری ظاهر شد. ظاهر شدن

- 14- Vodret B, Milia M, Orani MG, Serratrice G, Mancuso MR. Detection of genetically modified organisms in food: Comparison among three different DNA extraction methods. *Vet Res Commun*. 2007;31 Suppl 1:385-8.
- 15- Grobe D, Raab C. Voters' response to labeling genetically engineered foods: Oregon's experience. *J Consum Aff*. 2004;38(2):320-31.
- 16- Brune PD, Culler AH, Ridley WP, Walker K. Safety of GM crops: Compositional analysis. *J Agric Food Chem*. 2013;61(35):8243-7.
- 17- Ghazizadeh E, Mousavi A, Hadi F, Hashemi Sohi H. Detection of transgenic roundup ready soybean seeds by molecular methods. *J Cell Mol Res*. 2015;27(4):555-64.
- 18- Xu J, Miao H, Wu H, Huang W, Tang R, Qiu M, et al. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Biosens Bioelectron*. 2006;22(1):71-7.
- 19- Arugula M, Chanysheva A, Vaglenov K, Simionian A. Biosensors for detecting genetically modified organisms in food and feed. *ECS Trans*. 2015;66(36):31-8.
- 20- Randhawa G, Singh M, Sood P. DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain. *Curr Sci*. 2016;110(6):1000-9.
- 21- Wani SH, Sah SK, Sági L, Solymosi K. Transplastomic plants for innovations in agriculture, a review. *Agron Sustain Dev*. 2015;35(4):1391-430.
- 22- He S, Song B, Li D, Zhu C, Qi W, Wen Y, et al. A graphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent DNA analysis. *Adv Funct Mater*. 2010;20(3):453-9.
- 23- Maiti R, Manna S, Midya A, Ray SK. Broadband photoresponse and rectification of novel graphene oxide/n-Si heterojunctions. *Opt Express*. 2013;21(22):26034-43.
- 24- Huang P, Xu Ch, Lin J, Wang C, Wang X, Zhang Ch, et al. Folic acid-conjugated graphene oxide loaded with photosensitizers for targeting photodynamic therapy. *Theranostics*. 2011;1:240-50.
- 25- Liu B, Sun Z, Zhang X, Liu J. Mechanisms of DNA sensing on graphene oxide. *Anal Chem*. 2013;85(16):7987-93.
- 26- Mao Y, Chen Y, Li S, Lin S, Jiang Y. A graphene-based biosensing platform based on regulated release of an aptameric DNA biosensor. *Sensors (Basel)*. 2015;15(11):28244-56.
- 1- Hashemi M, Shoja Sadati A. Genetically - modified food: Opportunities & challenges. *J Food Sci Technol*. 2010;7(24):89-102. [Persian]
- 2- Marsden T, Sonnino R. Rural development and the regional state: Denying multifunctional agriculture in the UK. *J Rural Stud*. 2008;24(4):422-31.
- 3- Sonnino R, Marsden T. Beyond the divide: Rethinking relationships between alternative and conventional food networks in Europe. *J Econ Geogr*. 2006;6(2):181-99.
- 4- Brookes G, Barfoot P. Economic impact of GM crops. *GM Crops Food Biotechnol Agric Food Chain*. 2014;5(1):65-75.
- 5- Maliga P. Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2002;5(2):164-72.
- 6- Maliga P. Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:289-313.
- 7- Goodman RE, Panda R, Ariyaratna H. Evaluation of endogenous allergens for the safety evaluation of genetically engineered food crops: Review of potential risks, test methods, examples and relevance. *J Agric Food Chem*. 2013;61(35):8317-32.
- 8- Goodman RE. Biosafety: Evaluation and regulation of genetically modified (GM) crops in the United States. *J Huazhong Agric Univ*. 2014;33(6):83-109.
- 9- Mehdizadeh M, Rabiei M, Alebooyeh M, Rastegar H. Labeling of genetically modified foods and Consumers' rights. *Iran J Med Law*. 2011;5(16):115-29. [Persian]
- 10- Camacho A, Van Deynze A, Chi-Ham C, Bennett AB. Genetically engineered crops that fly under the US regulatory radar. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1087-91.
- 11- Schnier DJ. Genetically Modified Organisms and the Cartagena Protocol. *Fordham Environ Law Rev*. 2001;12(2):376-415.
- 12- CAC/GL 45-2003 Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant. [Internet]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO); 2003 [cited 2013, Jul, 26]. Available from: http://files.foodmate.com/2013/files_1782.html.
- 13- Tracy T. GMO labeling faces ballot test in Oregon, Colorado [Internet]. New York City: The Wall Street Journal; 2014 [cited 2014, Nov, 2]. Available from: <https://www.wsj.com/articles/gmo-labeling-faces-ballot-test-in-oregon-colorado-1414961328>.