مقاله علمی مروری

مجله دوفصل نامه

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

ISSN 2588-5073 چاپی

ISSN 2588-5081 الکترونیکی

دوره ۱۰، شماره ۲، پاییز وزمستان ۱۴۰۰

صفحه ۳۱۰-۲۹۹

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3

DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2
2022

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

ایمنی *cry*IAc برای انسان، دام و محیط زیست

Safety of cryIAc for human, animals and environment

سید الیاس مرتضوی[۱*]، امیربهرام مرادی[۲]

Sayyed-Elyass Mortazavi[1*], Amir-Bahram Moradi[2]

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، اتوبان تهران -کرج، ایران

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. PhD student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Pajoohesh Town, Tehran - Karaj Highway, Tehran, Iran

Corresponding Author, Email: : نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی

mortazavi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۰)

چکیده

نظر به اهمیت ارزیابی ایمنی تراژن برای استفاده در برنامه‌های مهندسی ژنتیک و تولید محصول تراریخته، یک مطالعه کتابخانه‌ای و بیوانفورماتیک برای ارزیابی ایمنی ژن *cry*IAc و پروتئین CryIAc برای انسان، دام و محیط زیست انجام شد. در این بررسی ابتدا ضمن تشریح مکانیسم مولکولی عملکرد این ژن در اتصال به گیرنده‌های خاص خود در روده میانی لارو حشرات هدف، اختصاصی بودن این گیرنده‌ها و عدم وجود آن در سایر موجودات نشان داده شد. جنبه بعدی ایمنی، بررسی هضم کامل در شرایط شبیه‌سازی‌شده شیره‌های معده‌ای و روده‌ای است. مطالعات مختلفی که تاکنون انجام شده‌اند، حاکی از هضم‌پذیری کامل این ژن و پروتئین در دستگاه گوارش پستانداران و به ویژه انسان است. نشان داده شده است که افزوده شدن پروتئین خالص به جیره غذایی جانوران آزمایشگاهی باعث بروز هیچ مشکلی نشده است و افزودن آن به صورت غذای کامل نیز در جانوران آزمایشگاهی و دام‌ها هیچگونه مشکل و یا تغییری نسبت به جیره‌های بدون آن پروتئین نداشته است. سپس احتمال سمیت‌زایی پروتئین CryIAc مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این پروتئین هیچ تشابهی با پروتئین‌های سمّی شناخته‌شده ندارد و لذا احتمال وجود سمّیّت در آن منتفی است. آلرژی‌زایی این پروتئین نیز با ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت و هیچ‌گونه حساسیت‌زایی در آن مشاهده نشد. در نهایت جنبه‌های زیست محیطی پروتئین CryIAc از نظر بقا و پایداری در محیط چه به صورت خالص و چه به صورت بقایای گیاهی مد نظر قرار گرفت. نتایج حاکی از تجزیه سریع این پروتئین در خاک و ایمنی کامل آن برای محیط زیست است. از این رو، ایمنی کامل این پروتئین برای انسان، دام و محیط زیست به اثبات می‌رسد.

واژه‌های کلیدی

ایمنی زیستی،
مهندسی ژنتیک،
پروتئین CryIAc،
سمّیّت،
حسّاسیّت‌زایی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Risk assessment for a transgene is one of the key steps in the genetic transformation. In order to use *cry*IAc gene in production of transgenic plants, a library and *in-silico* research was performed to confirm the safety of the gene product for human consumption, animal feed and the environment. In the first step, the molecular mechanism of action of the CryIAc protein and its specific receptors in the midgut cells of the target organism was explored. Digestibility of the protein in the stomach and intestine liquids have been investigated based on the peer reviewed documents. It was demonstrated that the CryIAc protein could be completely digested in the stomach liquid of vertebrates, especially mammalians including the human. It was shown that addition of the pure protein into the animal diets did not result to any abnormalities in the growth pattern and also blood histochemistry of the experimental animals. Also, whole plant assays using the different diets contained the transgenic and non-transgenic plant materials in different experimental animals was discussed. These experiments did not result to any differences between the groups. Possibility of the toxic effect of the CryIAc protein was investigated via *in-silico* tools. The results did not show any similarity between the known toxic protein and the CryIAc protein. Allergenicity of the CryIAc protein was assessed *in-silico* in different ways. It was proven that there were any similarities between the protein and the other known allergens. At the end, the persistency of the CryIAc protein in the soil was explored. Since the different experiments on exposure of the pure protein or the transgenic plant tissues into the environment proved that the CryIAc protein is degraded easily in the soil, it could be concluded that the CryIAc protein is an environmental friendly protein. Eventually, the final conclusion is that the CryIAc protein is a safe protein for human consumption, animal use and the environment, and could be used safely in genetic engineering programs.

Keywords: Biosafety, genetic engineering, CryIAc protein, toxicity, allergenicity.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

مقدمه

یکی از جنبه‌های بسیار مهم ایمنی زیستی، ایمنی استفاده از یک ژن یا توالی DNA در مهندسی ژنتیک و تولید محصولات تراریخته است. مهندسین ژنتیک پیش از شروع یک برنامه پژوهشی برای تولید یک محصول تراریخته، ابتدا سعی می‌کنند تا از ایمنی توالی‌ها و پروتئین‌هایی که در این برنامه استفاده می‌کنند، اظمینان حاصل کنند. اهمیت این بررسی در آن است که حتی اگر آن برنامه پژوهشی در ایجاد صفت مورد نظر پژوهشگر موفق هم باشد، طبق مفاد قوانین موضوعه کشور به ویژه، قانون ایمنی زیستی و قانون الحاق به پروتکل ایمنی زیستی کارتاهنا، امکان رهاسازی و استفاده تجاری از آن محصول منتفی خواهد بود.

مدیریت آفات یکی از صفات مهم اصلاحی در برنامه‌های مهندسی ژنتیک است. برای تولید گیاهان مقاوم به آفات از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود ولی بی‌گمان، استفاده از ژن‌های پروتئین کریستالی تاکنون موفق‌ترین شیوه برای تحقق این هدف بوده است. این ژن‌ها از سویه‌های مختلف باکتری *باسیلوس تورینژینسیس* (*Bacillus thurigiensis*) جداسازی شده‌اند. حدود نیم قرن است که سویه‌های مختلف این باکتری در تولید حشره‌کش‌های میکروبی مورد استفاده بوده‌اند. یکی از این ژن‌ها، *cry*IAc است که از سویه کورستاکی (kurstaki) این باکتری جداسازی شده و پروتئینی موسوم به CryIAc را رمزدهی می‌کند که دارای خاصیت کشندگی برای لارو بسیاری از حشرات خانواده پروانه‌هاست. از این ژن در برنامه‌های مهندسی ژنتیک برای تولید محصولات تراریخته مقاوم به آفات پروانه‌ای استفاده شده است که رخدادهایی از محصولات پنبه و ذرت از آن جمله‌اند (Betz *et al.* 2000).

علیرغم اینکه سال‌هاست هم حشره‌کش میکروبی مبتنی بر سویه حاوی این ژن و هم محصولات تراریخته حاوی ژن و پروتئین

مذکور مورد استفاده ایمن بوده‌اند، ولی از آنجا که طبق قوانین ملی و بین‌المللی، هر کشوری می‌تواند طبق مقررات خود نسبت به بررسی محصولات تراریخته اقدام کند، با توجه به اینکه این ژن در برنامه‌های مهندسی ژنتیک کشور در حال استفاده است، لازم است تا ایمنی این ژن و محصول پروتئینی آن برای انسان، دام و محیط زیست تبیین شده و به اثبات برسد. این مطالعه و پژوهش به همین منظور انجام شده است و جنبه‌های مختلف ایمنی پروتئین CryIAc را به روش کتابخانه‌ای و روش‌های بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار داده است.

نوع عملکرد و اختصاصی بودن پروتئین CryIAc

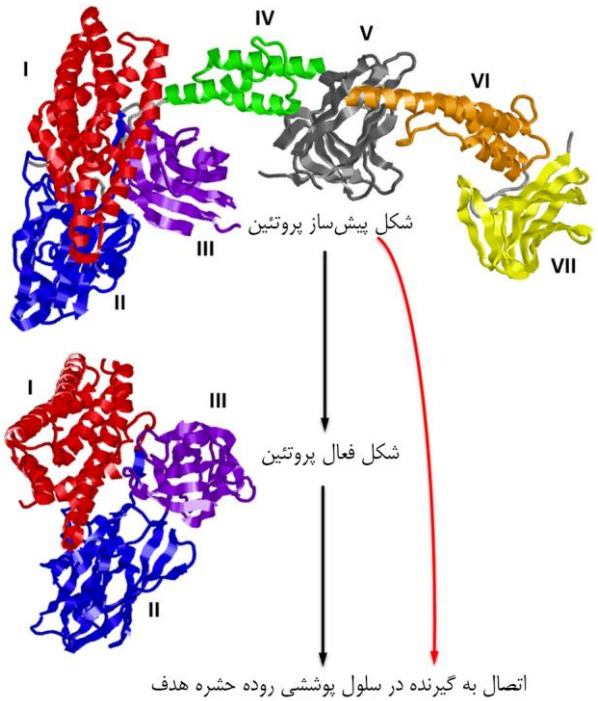
پروتئین CryIAc در اصل به صورت یک کریستال غیرمحلول در مراحل اسپورزایی باکتری *باسیلوس تورینژینسیس* تولید می‌شود. این پروتئین کریستالی ابتدا به شکل پیش‌ساز آن به نام دلتا-اندوتوکسین CryIAc به وجود می‌آید. هزاران واحد از این پروتئین کریستالی در اسپور باکتری که به صورت کریستال‌های نامحلول هستند، به هم می‌پیوندند تا یک کریستال بزرگ قابل رویت در زیر میکروسکوپ را تشکیل دهند. برای شروع فعالیت حشره‌کشی این شکل از پروتئین CryIAc، ابتدا این پروتئین باید توسط حشره‌ی هدف خورده شود. دلتا-اندوتوکسین CryIAc در معده‌ی حشره بدلیل pH بالا یا قلیایی آن ابتدا به صورت محلول در می‌آید و واحدهای آن از هم جدا می‌شوند و سپس با هضم پروتئولیتیک به بویژه با آنزیم تریپسین معده حشره به هسته فعال پروتئین شکسته می‌شود. در این فرایند هضم، پایانه N تمام پروتئین‌ها شکسته می‌شود و در برخی از آنها یک دنبالچه در پایانه C پروتئین نیز قطع می‌شود (شکل ۱). باقیمانده پروتئین بعد از هضم که فرم فعال پروتئین را تشکیل می‌دهد، نسبت به تجزیه بیشتر به وسیله‌ی پروتئازهای معده مقاوم است. این پروتئین فعال به گیرنده‌های مخصوصی در سلول‌های پوششی (اپیتلیال) معده میانی حشرات پروانه‌ای متصل شده و کانال‌های ویژه-کاتیونی (شکل ۲) را به وجود می‌آورد (Pardo-Lopez *et al.* 2013). این وقایع، فرآیندهای هاضمه‌ای را مختل کرده و منجر به مرگ حشره می‌گردد. اخیراً کشف شده است که قسمت حذف‌شده از فرم دلتا-اندوتوکسین و خود فرم پیش‌ساز یا دلتا-اندوتوکسین نیز می‌تواند در ایجاد فعالیت حشره‌کشی تأثیر داشته باشد (Tabashnik *et al.* 2015؛ شکل ۱).

نمای مولکولی مکانیسم عمل پروتئین CryIAc در شکل ۲ آورده شده است تا اختصاصی بودن عملکرد آن تبیین شود. توجه به شکل فضایی پروتئین کریستالی (شکل ۱) در تجسم عملکرد آن در پیوند با لیگاندهای این فرایند موثر است. نخستین پیوند فرم فعال پروتئین در لارو پروانه‌ها یک پیوند به نسبت سست با گیرنده‌های آلکالین فسفاتاز (ALP) و آمینوپپتیداز (APN) است. ثابت تفکیک این پیوندها به ترتیب برابر ۱۰۱ و ۲۶۷ نانومتر است. پیوند پروتئین CryIAc با گیرنده آمینوپپتیداز از طریق حلقه ۳ دامین II پروتئین، و با گیرنده آلکالین فسفاتاز از طریق رشته β16 دامین III صورت می‌گیرد. هر دوی گیرنده‌های ALP و APN بسیار فراوان بوده و از طریق یک قلاب گلایکوزیل فسفاتیدیل‌اینوزیتول محکم بر روی غشای سلولی قرار گرفته‌اند.

پیوند پروتئین CryIAc با ALP و APN باعث می‌شود که پروتئین فعال‌شده بر روی غشای پُر چین و چروک سلول‌های روده میانی یعنی جایی متمرکز شود که پروتئین CryIAc بتواند پیوند مستحکمی با ثابت تفکیک ۱ نانومتر با گیرنده کادهرین-مانند (CAD) برقرار کند (شکل ۲). تعامل CryIAc با CAD یک تعامل پیچیده است که از طریق سه اپی‌توپ از ناحیه‌ی بیرونی CAD به نام های CR7، CR11 و CR12 صورت می‌گیرد که CR12 در آن ناحیه از کادهرین قرار گرفته است که نزدیک به غشای سلولی است. این اپی‌توپ‌های پروتئین CAD با لوپ ۲، ۳ و مارپیچ α-8 از دامین II پروتئین CryIAc در تعامل است و این امر باعث شروع جداشدن ترمینال N این پروتئین و از جمله مارپیچ α-1 از دامین I آن می‌شود.

شواهد حاکی از آن است که جداشدن این مارپیچ از دامین I، قسمت آبگریز CryIAc را در معرض غشای سلولی قرار می‌دهد (که آن هم آبگریز است) و بر این مبنا، این فرضیه ارائه شده است که جداشدن مارپیچ α-1 برای شروع تشکیل یک ساختار متشکل از چهار واحد از این پروتئین CryIAc که پیش‌ساز کانال کاتیونی خواهد شد، ضروری است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]



شکل ۱- شکل پیش‌ساز پروتئین CryIAc (دارای شش تکه یا دامین با شماره‌های I تا VII) که طبق مدل کلاسیک در معده حشره با اثر آنزیم‌های هضم‌کننده پروتئین با حذف دامین‌های چهار، پنج، شش و هفت به شکل فعال در می‌آید. این فرم فعال پروتئین CryIAc (دارای دامین‌های I تا III) به گیرنده‌های سلول‌های اپیتلیال (پوششی) قسمت میانی دستگاه گوارش حشره هدف متصل می‌شود. با این وجود، قسمت‌های حذف‌شده نیز در یک مسیر دیگر می‌توانند در ایجاد سمیت در حشره نقش داشته باشند که این امر به ویژه در حشرات مقاوم که مسیر اول در آنها دستخوش تغییراتی از قبیل کاهش اتصال فرم فعال پروتئین به گیرنده‌های روده میانی حشره شده است، اهمیت می‌یابد. در هر دوی این مسیرها، اتصال پروتئین به گیرنده‌ها باعث شروع فرایند اثرگذاری پروتئین بر حشره می‌شود. نکته حائز اهمیت دیگر این است که هر دامین، خود از چند قسمت دیگر تشکیل شده است که مارپیچ‌های آلفا (α-هلیکس‌ها) از آن جمله‌اند (Tabashnik et al. 2015).

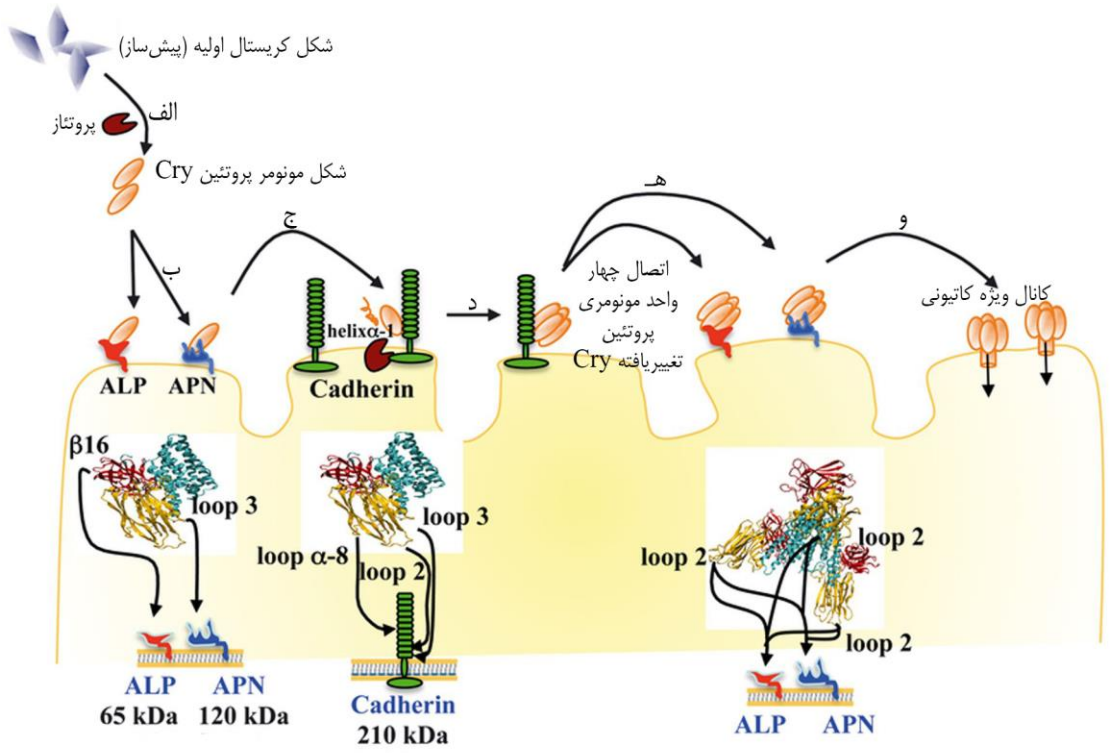
Figure 1. CryIAc protoxin (I-VII domains) in the classical model (black arrows), in which the inactive Cry1Ac protoxin must be converted to activated toxin by removing IV-VII domains. The activated protein (domains I-III) will be binded to insect midgut receptors to exert toxicity. But, either intact protoxin or part of the protoxin other than the activated toxin also contributes to toxicity in a secondary toxic pathway (red arrow) that can be especially important in resistant insects with disruptions in the primary pathway, such as reduced binding of activated toxin to midgut receptors. It is notable that each domain in the protein may be consisted from several parts including α-helices.

به هر حال، این الیگومر چهار واحدی به نحوی در کنار هم قرار می‌گیرند که فضای بین آنها به صورت یک حفره عمل می‌کند (شکل ۳). قرار گرفتن این الیگومر چهار واحدی در داخل غشا، یک کانال کاتیونی به وجود می‌آورد که از طریق آن تبادل کاتیونی بین داخل و خارج غشا صورت می‌گیرد. این امر باعث اختلال در فرایندهای تبادل کاتیونی عادی در آن سلول شده و در نهایت به مرگ سلولی می‌انجامد (Pardo-Lopez *et al.* 2013).

آنچه در این فرایند حائز اهمیت است آن است که آنزیم‌هایی مثل آلکالین فسفاتاز و آمینوپپتیداز که در اتصال اولیه CryIAc نقش دارند، در اصل بسیار پلی‌مورف و متفاوت هستند و در حتی در یک موجود نیز چندین نوع مختلف از آنها وجود دارد (*et al.* 2015Stefkova؛ Taylor, 1993). از این رو، گیرنده‌های آنها در روده موجودات مختلف نیز تفاوت دارند. این مطلب بدین معناست که پروتئین CryIAc تنها می‌تواند با گیرنده‌های خاصی از ALP و APN که تنها در روده میانی برخی از حشرات پروانه‌ای وجود دارد، وارد تعامل شود.

نظیر این وضعیت برای پروتئین کادهرین (Cadherin=Calcium-dependent Adhesion) نیز وجود دارد. پروتئین‌های کادهرین دسته‌ای از پروتئین‌ها هستند که در اتصال سلول‌ها و در کنار هم نگه داشتن آنها نقش دارند. این پروتئین‌ها بسیار متنوع هستند. در مهره‌داران بیش از یکصد نوع و در بی‌مهرگان نیز حدود ۲۰ نوع کادهرین مختلف وجود دارد (Offermanns Rosenthal, 2008؛ Harvey *et al.* 2013). اتصال پروتئین CryIAc فعال‌شده به کادهرین هم بسیار اختصاصی است و با توجه به وجود انواع مختلف از این پروتئین در موجودات مختلف، پروتئین CryIAc فقط قادر به تعامل با کادهرین متناظر خود است که همانگونه که ذکر شد، در روده میانی لارو حشرات پروانه‌ای یافت می‌شود. به همین دلیل است که CryIAc حتی برای همه حشرات نیز سمّیّت و کشندگی نخواهد داشت و فقط بر انواعی از لارو پروانه‌ها موثر است (Hofmann *et al.* 1998؛ Betz *et al.* 2000).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]



شکل ۲- نمای شماتیک مکانیسم عمل پروتئین CryIAc در پروانه‌ها در سطح مولکولی. الف) هضم پیش‌ساز پروتئین کریستالی (CryIAc) در دستگاه گوارش حشره و فعال‌سازی آن بوسیله پروتئازها و تشکیل فرم فعال پروتئین؛ ب) اتصال سست مونومر پروتئین CryIAc به گیرنده‌های آلکالین فسفاتاز (ALP) و آمینوپپتیداز (APN)؛ در اثر این پیوند، پروتئین CryIAc در نزدیکی غشای سلولی قرار می‌گیرد. ج) اتصال محکم پروتئین CryIAc به گیرنده کادهرین بر روی سلول غشایی؛ این فرایند باعث جدا شدن پایانه N پروتئین CryIAc می‌شود که مارپیچ آلفای شماره ۱ آن هم در قسمت حذف‌شده قرار می‌گیرد. د) پروتئین باقی‌مانده قابلیت اتصال به یکدیگر و تشکیل یک الیگومر ٤ واحدی را پیدا می‌کند. این الیگومر، شکل پیش‌ساز کانال کاتیونی است. هـ) الیگومر تشکیل‌شده به گیرنده‌های آلکالین‌فسفاتاز و آمینوپپتیداز محکم متصل می‌شود؛ و) الیگومر تشکیل‌شده که شبیه کانال‌های ویژه یونی است به درون غشای سلولی نفوذ کرده و در داخل آن طوری قرار می‌گیرد که یک سوراخ بر روی غشا به وجود آید. این مکانیسم برای سایر پروتئین‌های کریستالی خانواده CryI نیز صادق است (Pardo-Lopez et al. 2013).

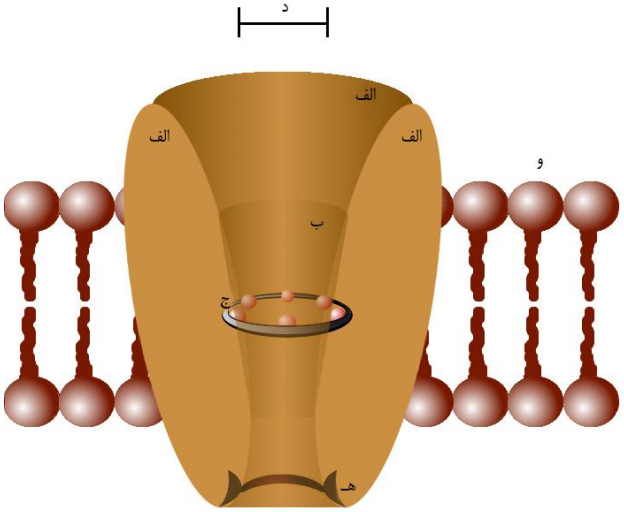
Figure 2. Schematic representation of the mechanism of action of CryIAc toxins in Lepidoptera at the molecular level. A) the larvae ingest the 3dCry protoxin, which is solubilized in the midgut lumen of the larvae due to high pH and reducing conditions and activated by gut proteases generating the toxin fragment. B) the monomeric CryIAc toxin binds ALP and APN receptors; in a low-affinity interaction, the toxin is then located in close proximity to the membrane. C) the monomeric CryIAc toxin binds the CAD receptor in a high-affinity interaction and this interaction induces proteolytic cleavage of the N-terminal end of the toxin, including helix a-1 of domain I. D) the cleaved CryIAc toxin is then able to oligomerize in a toxin prepore oligomer. E) the oligomeric CryIAc structure binds to ALP and APN receptors with high affinity. F) the prepore inserts into the membrane causing pore formation.

هضم پروتئین CryIAc در مایعات شبیه‌سازی شده معدی و روده‌ای

با اینکه توضیح داده شد که پروتئین CryIAc در محیط قلیایی معده لارو حشرات پروانه‌ای به فرم فعال تبدیل می‌شود، لازم است نشان داده شود که در محیط اسیدی چگونه رفتار می‌کند. اهمیت این بررسی در آن است که معده مهره‌داران و از جمله انسان دارای شرایط اسیدی است و رفتار پروتئین CryIAc در این محیط در بررسی ایمنی آن موثر است. عدم وجود اثرات سمّی پروتئین CryIAc در انسان و سایر پستانداران در بررسی‌های درون شیشه‌ای هضم معدی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

شده است که این پروتئین در شیره بازسازی‌شده‌ی معده‌ای به سرعت تخریب می‌شود. در یک آزمایش سرعت تخریب پروتئین CryIAc به طور جداگانه در شیره‌های شبیه‌سازی‌شده معدی (پپسین در pH:1.2) و روده‌ای (پانکریتین در pH:7.5) مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳- ساختار یک کانال کاتیونی عادی در غشای سلولی؛ الف) بدنه کانال که در حالت عادی از چهار دامین تشکیل شده است؛ ب) معبر کانال؛ ج) فیلتر انتخاب‌کننده؛ د) شاخص قطر فیلتر انتخاب‌کننده؛ هـ) مکان فسفوریلاسیون؛ و) غشای سلولی. ساختاری که توسط اتصال چهار واحد از پروتئین CryIAc تشکیل می‌شود، به این ساختار بسیار شبیه است ولی فاقد فیلتر انتخاب‌کننده است. در نتیجه، عبور کاتیون‌ها از غشای سلولی میزبان را مختل می‌کند (شکل از ویکیپدیا: https://en.wikipedia.org/wiki/Ion_channel#/media/File:Ion_channel.png).

Figure 3. Schematic diagram of an ion channel in the cell mambrane. A) channel domains which is typically consisted from four domain per channel. B) outer vestibule. C) selectivity filter. D) diameter of selectivity filter. E) phosphorylation site. F) cell membrane. Four activated CryIAc proteins construct a similar channel without a selectively filter, so that interrupt cathion transportation through cell membrane.

در این مطالعه، شیره‌های شبیه‌سازی‌شده معدی و روده‌ای بر اساس توصیه‌های کتاب دستورالعمل داروسازی آمریکا درسال ۱۹۹۵ تهیه گردیدند. در ادامه، تخریب پروتئین CryIAc با استفاده از آنالیز وسترن بلات و بررسی تأثیر آن بر روی حشرات هدف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین CryIAc در عرض ۳۰ ثانیه پس از تماس با شیره معدی تخریب می‌شود (Betz *et al.* 2000). خاصیت اسیدی شیره معده باعث تغییر شکل طبیعی پروتئین CryIAc و تسهیل تخریب سریع آن می‌شود. در ادامه آزمایش، هنگامی که پروتئین CryIAc بدون قرار گرفتن در شیره معده، در شیره‌ی روده‌ای قرار داده شد، به شکل پایدار در برابر پروتئاز تبدیل شد و به مدت ۲۱ ساعت بصورت سالم و فعال باقی ماند. با این حال باید توجه داشت که در شرایط طبیعی تغذیه، پروتئین CryIAc پیش از ورود به دوازدهه، در معرض مایع معدی قرار می‌گیرد. از این رو انتظار می‌رود که pH پایین (اسیدی) و آنزیم پپسین موجود در معده، پروتئین را بطور کامل هضم کرده و یا آنرا آماده هضم در روده کند. از این رو، نتایج این مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین CryIAc در صورت ورود به دستگاه گوارش انسان، به سرعت مورد هضم قرار گرفته و از بین می‌رود. در نتیجه شیرابه واردشده به دئودنوم فاقد پروتئین CryIAc خواهد بود.

عدم تشابه توالی پروتئین CryIAc به سموم پروتئینی شناخته‌شده

یکی از راه‌های بررسی اثرات بالقوّه سمّی برای یک پروتئین جدید، مقایسه توالی آمینواسیدی آن با پروتئین‌های سمّی شناخته شده است. فرض بر این است که پروتئین‌های مشابهی که از یک منشأ مشترک مشتق شده‌اند و توالی‌های آمینواسیدی مشابهی هم دارند، از نظر ساختاری مشابه بوده و عملکرد مشابهی نیز داشته باشند. بدیهی است که وارد کردن یک قطعه DNA که پروتئینی مشابه با یک پروتئین سمّی را رمزدهی می‌کند به هیچ وجه مطلوب نیست.

همولوژی بین پروتئین‌ها از طریق مقایسه درجه تشابه آمینواسیدی بین پروتئین‌ها با استفاده از ضوابط منتشرشده تعیین می‌گردد (Doolittle *et al.* 1990). برای تحقق این امر از پایگاه‌های ذخیره اطلاعات پروتئینی استفاده شد که مهم‌ترین آنها عبارتند از PIR (Protein Information Resource, PIR: http://pir.georgetown.edu)، EMBL (European Molecular Biology Laboratory, EMBL: https://www.embl.de)، UniProt/SwissProt (http://www.uniprot.org) و GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین CryIAc با استفاده از ابزارهای جستجوی موجود در هر

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

یک از این بانک‌های اطلاعاتی پروتئین با توالی کلیّه سموم پروتئینی شناخته‌شده و ذخیره‌شده در هر یک از این بانک‌های اطلاعاتی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین CryIAc در هیچ از این بانک‌های اطلاعاتی، تشابه آمینواسیدی معناداری با پروتئین‌های سمّی موجود در این بانک‌ها نداشته و صرفاً با سایر پروتئین‌های Cry مشابهت داشت. این نتیجه همگام با نتایج سایر آزمایش‌های بالینی که با هدف بررسی سمّیّت پروتئین CryIAc انجام شده‌اند به این معناست که احتمال نمی‌رود که این پروتئین به جز برای حشره هدف برای سایر موجودات سمّیّتی داشته باشد.

عدم تشابه توالی پروتئین CryIAc با آلرژن‌های شناخته شده

علاوه بر بررسی احتمال سمّیّت برای یک پروتئین، بررسی احتمال آلرژی‌زایی آن نیز مورد توجه است. نکته مهم آن است که یک روش زیست‌سنجی پیشگویانه برای بررسی قدرت حساسیت‌زایی پروتئین‌ها در انسان وجود ندارد (US FDA, 1992)، اما با این وجود، بررسی پروفایل فیزیکوشیمیایی و تعیین آستانه در معرض قرارگیری پروتئین برای انسان، پایه و اساسی برای ارزیابی حساسیت‌زایی آن پروتئین در انسان از طریق مقایسه این خصوصیات با پروتئین‌های حساسیت‌زای شناخته شده به وجود می‌آورد. بنابراین، نکات با اهمیّت در تعیین میزان حساسیت‌زایی پروتئین‌هایی که از طریق خوراکی مصرف می‌شوند شامل در معرض پروتئین قرار گرفتن و ارزیابی عواملی که در این موضوع نقش دارند از قبیل پایداری آن پروتئین در برابر هضم، مقدار آن در غذا و الگوی (میزان) مصرف آن غذای خاص خواهد بود (Kimber *et al.* 1999؛ Metcalfe *et al.* 1996).

بر این اساس، یک عامل کلیدی در تعیین حساسیت سیستمیک یک پروتئین غذایی، پایداری آن در برابر هضم معدی-روده‌ای بویژه پایداری آن در برابر پروتئازهای اسیدی مانند پپسین موجود در معده است (Astwood *et al.* 1996؛ Astwood and, Fuchs, 1996؛ Fuchs and Astwood, 1996؛ Kimber *et al.* 1999). در صورتی که آلرژن‌های مهم غذایی به موکوس‌های روده‌ای یعنی جایی که واکنش ایمنی شروع می‌شود برسند، در برابر هضم پپتیدی و محیط اسیدی معده پایداری نشان داده‌اند. همانگونه که پیش از این شرح داده شد، ارزیابی قابلیت هضم پروتئین CryIAc در محیط درون شیشه‌ای نشان داد که این پروتئین‌ها براحتی هضم می‌شوند.

یک عامل مهم دیگر که در میزان حساسیت‌زایی پروتئین‌های غذایی نقش دارد، غلظت بالای آنها در غذا است (Taylor *et al.* 1987؛ Taylor, 1992؛ Fuchs and Astwood, 1996). بیشتر آلرژن‌هایی که در یک غذای بخصوص وجود دارند، از ۳-۲ درصد الی ۸۰ درصد پروتئین کل آن غذا را تشکیل می‌دهند (Fuchs and Astwood, 1996). در تضاد با این وضعیت، پروتئین CryIAc به میزان کمی در گیاهان تراریخته حاوی آنها وجود داشته‌اند و از این رو، احتمال حساسیت‌زایی آن بسیار اندک خواهد بود (Betz *et al.* 2000).

علی‌رغم این توضیحات، یک راه مؤثر برای تعیین اینکه یک پروتئین، حساسیت‌زا است یا اینکه با چه احتمالی ساختاری دارد که با پروتئین‌های دیگر وارد تعامل می‌شود، مقایسه توالی آمینواسیدی آن با آلرژن‌های شناخته شده است. برای این منظور یک پایگاه داده‌های توالی‌های پروتئینی مربوط به آلرژی و بیماری سلیاک با استفاده از پایگاه‌های داده‌های پروتئینی (GenBank، EMBL، PIR و SwissProt) ایجاد شده است.

برای بررسی توالی‌های آمینواسیدی پروتئین CryIAc و مقایسه آن با توالی‌های شناخته‌شده در این پایگاه داده‌ها، ابتدا کل توالی ۱۱۷۸ اسید آمینه‌ای پروتئین CryIAc با پروتئین‌های آلرژن مورد مقایسه قرار داده شد که هیچ‌گونه تشابه معنی‌داری با پروتئین‌های آلرژن شناخته‌شده این پایگاه نشان نداد. در گام بعدی، مقایسه قطعات ۸۰ اسیدآمینه‌ای پروتئین CryIAc با پروتئین‌های آلرژن انجام شد. در مجموع ۱۰۹۹ قطعه ۸۰ اسیدآمینه‌ای به دست می‌آید که با پروتئین‌های آلرژن مورد مقایسه قرار داده می‌شود. نتایج این بررسی نیز نشان داد که هیچیک از این قطعات ۸۰ اسیدآمینه‌ای مشابهت بیش از ۳۵ درصدی با آلرژن‌های شناخته‌شده نشان نمی‌دهند. این نتیجه به این معناست که قطعات ۸۰ اسیدآمینه‌ای حاصل از هضم ناقص پروتئین CryIAc نیز حساسیت‌زایی نخواهند داشت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

مرحله بعدی این بررسی، مقایسه اپی‌ژن‌های ۸ اسیدآمینه‌ای پروتئین CryIAc با اپی‌توپ‌های پروتئین‌های ایمیونوگلوبولین است. از آنجا که واکنش‌های حساسیت‌زایی، بخشی از واکنش‌های ایمنی است که با اتصال توالی‌های پپتیدی هدف (اپی‌ژن‌ها) از ماده آلرژن با اپی‌توپ‌های ایمیونوگلوبولین‌های دستگاه ایمنی بدن شروع می‌شود، و از آنجا که این اپی‌ژن‌ها دارای طولی در حدود ۸ اسیدآمینه هستند، در این بررسی از قطعات ۸ اسیدآمینه‌ای پروتئین CryIAc برای مقایسه با اپی‌توپ‌های ایمیونوگلوبولین‌ها استفاده شد. در مجموع ۱۱۷۱ قطعه ۸ اسیدآمینه‌ای مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این مقایسه، هیچ مشابهتی با اپی‌ژن‌های حساسیت‌زایی شناخته‌شده نشان نداد. این نتیجه نیز تأیید دیگری برای عدم حساسیت‌زایی پروتئین CryIAc به دست می‌دهد.

بطور خلاصه، این داده‌ها و تجزیه و تحلیل‌ها بیان می‌دارند که پروتئین CryIAc ریسک حساسیت‌زایی قابل توجهی ندارند، از منابع حساسیت‌زا مشتق نشده‌اند، از نظر ایمنی‌شناختی مشابهت توالی با آلرژن‌های شناخته شده ندارند، مشخصات پروتئین‌های حساسیت‌زای خلاصه شده را نیز ندارند. این استنتاج از طریق عدم وجود گزارشی مبنی بر حساسیت‌زایی فرمولاسیون‌های میکروبی تجاری و حساسیت‌زایی پروتئین‌های Cry نیز تائید می‌شود (McClintock *et al.* 1995).

عدم سمّیّت دهانی حادّ پروتئین CryIAc در موش و خرگوش

با اینکه به صورت نظری و آزمایشگاهی نشان داده شد که پروتئین CryIAc در شیره معده به سرعت تخریب می‌گردد، باید نشان داده شود که در عمل نیز این اتفاق روی می‌دهد. برای این منظور از جانوران آزمایشگاهی نظیر موش و خرگوش استفاده می‌شود و پروتئین CryIAc در تغذیه آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنگاه آثار این پروتئین بر رشد، سلامت و دستگاه ایمنی آن موجود مورد بررسی قرار داده می‌شود.

این توضیح ضروری است که پروتئین‌های معدودی هستند که اگر وارد بدن موجود زنده شوند از خود خاصیت سمّی نشان می‌دهند. ولی در صورتی که یک پروتئین، سمّی باشد، حتی در دوزهای پائین هم باعث بروز واکنش‌های حادّ می‌شود (Sjoblad *et al.* 1992).

نتایج مطالعه بررسی سمّیّت دهانی حادّ در پستانداران حاکی از اختصاصی بودن پروتئین CryIAc برای حشرات پروانه‌ای و ایمنی آن برای سایر موجودات است. در یک مطالعه وقتی که پروتئین CryIAc خالص مطابق استاندارد اتحادیه اروپا و نیز راهنمای شماره ٤٠٧ سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD, 1995) بصورت دهانی به مدت ۲۸ روز به موش‌ها داده شد، هیچ مدرکی دال بر سمّیّت آن برای موش حتی در دوزهای بسیار بالا (٤٢٠٠ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن) به دست نیامد (Betz *et al.* 2000). بنابراین، پژوهشگران نتیجه گرفتند که پروتئین CryIAc به جز برای آفات هدف، برای سایر ارگانیسم‌ها سمّی نیست.

علاوه بر استفاده از پروتئین خالص در تغذیه یک موجود آزمایشگاهی مثل موش، ارزیابی غذای کامل نیز برای این پروتئین انجام شده است. در ارزیابی غذای کامل، یک غذای تهیه‌شده از محصول تراریخته حاوی این پروتئین به موجود هدف داده می‌شود و آثار رشد و جنبه‌های سلامت آن مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

ارزیابی ایمنی غذای کامل در حیوانات آزمایشگاهی مسائل خاص خود را به همراه دارد. یکی از این مسائل حداقل زمان لازم جهت انجام یک مطالعه حیوانی به منظور نشان دادن ایمنی مصرف طولانی مدت یک غذا است که بستگی به وجود داشتن یک پایگاه اطلاعاتی در مورد سمّیّت غذای مورد بررسی دارد. کمیته تخصصی FAO/WHO در سال ۲۰۰۰ یک بررسی ۹۰ روزه را پیشنهاد داد و مطالعات طولانی مدت‌تر احتیاطی را در صورتی توصیه کرد که نتایج این تست ۹۰ روزه متنوع باشد.

به هر حال مطالعات ارزیابی خطر توسط محققان مختلف بر روی موش صحرایی به عنوان موجودی که از نظر ژنوم، آنزیم‌ها و فیزیولوژی دارای مشابهت ۹۵ درصدی با انسان است، از طریق قراردادن آنها در معرض تغذیه با پنبه تراریخته حاوی پروتئین CryIAc بمدت ۱۳٦ روز انجام گردیده است. در این مطالعه، پارامترهای مختلفی از جمله وزن بدن، تغییر غذایی، هیستوپاتولوژی اندام‌ها و خصوصیات شیمیایی خون مورد ارزیابی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

قرار گرفتند. نتایج این مطالعات، هیچ گونه آثار سوء بر روی موش‌ها نشان داد و وضعیت موش‌های تغذیه‌شده با پنبه‌دانه تراریخته کاملاً مشابه وضعیت موش‌های تغذیه‌شده با پنبه‌دانه غیرتراریخته بود (Shahid *et al.* 2016). در همین مطالعه، تغذیه کرم خاکی با برگ پنبه تراریخته نیز هیچ گونه شواهدی دال بر اثرات سمّی پروتئین CryIAc نشان نداد.

برای انجام آزمایش‌های تکمیلی اطمینان‌آورتر از خرگوش به عنوان حیوان آزمایشگاهی به منظور تست ایمنی زیستی بذور و برگ‌های رخداد پنبه MON531 استفاده شده است. در این بررسی، والد غیر تراریخته به عنوان شاهد نیز در نظر گرفته شد. حیوانات به مدت ۹۰ روز (به عنوان کمترین نیاز جهت تظاهر ایمنی مصرف بلند مدت) با جیره غذایی تراریخته تغذیه شدند.

در این آزمایش ٤٢ خرگوش نر سفید سالم با جیره غذایی حاوی پنبه‌دانه پنبه تراریخته با ژن CryIAc، جیره غذایی متداول و ترکیبی از هر دو، مورد تغذیه قرار گرفتند و قبل از اعمال تیمار غذایی، ٤٥ روز پس از اعمال تیمار غذایی و ۹۰ روز پس از اعمال تیمار غذایی، از همه خرگوش‌ها جهت انجام آنالیزهای هماتولوژی و شیمیایی نمونه خون گرفته شد.

نمونه‌های کبد و کلیه جمع‌آوری شده از خرگوش‌های تغذیه شده با برگ و پنبه دانه تراریخته و غیرتراریخته هیچ گونه تغییرات هیستوپاتولوژیکال معنی‌داری از خود نشان ندادند و طبیعی بودند. همه مقادیر گلوکز خون، کلسترول و لاکتات دهیدروژناز (LDH) از نظر آماری بین گروه‌ها و میان هر گروه در نمونه‌های روز صفر، ٤٥ و ۹۰ مشابه بودند.

در این مطالعه، شاخص‌های هماتولوژیکال (تعداد لوکوسیت کل، تفاوت تعداد لوکوسیت‌ها، سرعت رسوب اریتروسیت و هموگلوبین) در گروه‌های شاهد و کنترل مشابه بودند. این مورد برای آنزیم‌های کبدی، بیلی‌روبین، کلسترول، قند خون تصادفی و LDH برای همه گروه‌های تیمار شده و شاهد نیز یکسان بود.

بعد از ۹۰ روز تیمار، نمونه‌های کبد و کلیه خرگوش ها برای مطالعات هیستوپاتولوژیکی جمع‌آوری گردید. نتایج نشان داد کبد و کلیه خرگوش‌های تیمار شده با پنبه دانه یا برگ گیاه پنبه تراریخته و غیرتراریخته هیچگونه تغییرات هیستوپاتولوژیکال مشخصی ندارند که این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات پیشین یکسان است (Rahman *et al.* 2015).

با توجه به نتایج بالا می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین CryIAc برای سایر موجودات غیرهدف به ویژه پستانداران کاملاً ایمن است.

بررسی‌های مربوط به ایمنی خوراک دام

یکی از جنبه‌های مهم بررسی ایمنی پروتئین CryIAc بررسی وضعیت آن در خوراک دام است. اهمیت این موضوع به تنها به خاطر احتمال تعامل این پروتئین با سایر ترکیبات موجود در آن گیاه است بلکه میزان بروز ژن و در نتیجه اثر آن مقدار پروتئین موجود در گیاه است. با این حال، سلامت آن غذا برای دام بیشترین اهمیت را در این زمینه داراست.

بررسی‌های خوراک دام هم بر روی دام‌های بزرگ و هم بر روی دام‌های کوچک قابل انجام است. دام‌های بزرگ، غذای بیشتری مصرف می‌کنند و در نتیجه اثر آن غذا را بهتر نیز به منصه ظهور می‌رسانند. با این وجود بسته به نوع گیاه حاوی آن پروتئین، در برخی از موارد دام‌های کوچک به ویژه طیور نیز مورد بررسی قرار داده می‌شوند.

در مطالعات خوراک دام برای پروتئین CryIAc، سلامت غذایی پنبه‌دانه تراریخته از طریق تغذیه گاوهای شیری با رژیم غذایی حاوی پنبه‌دانه خام از هر دو رقم پنبه تراریخته و رقم شاهد مورد بررسی قرار داده شده است. در این بررسی، عواملی از قبیل میزان شیر، ترکیبات شیر، وجود پروتئین CryIAc در شیر، رشد گاو و وضعیت بدنی آن مورد نظر قرار داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که پنبه‌دانه تراریخته عملکردی مشابه با پنبه شاهد دارد و تفاوت معنی‌داری در مقدار شیر تولیدشده، ترکیبات شیر و وضعیت رشد و لاشه گاوها در دوره آزمایش و پس از آن وجود نداشت (Castillo *et al.* 2001).

علاوه بر این در آزمایش‌های انجام‌شده دیگر، هیچ مقداری از DNA نوترکیب و نیز پروتئین هضم‌نشده CryIAc در دستگاه گوارش قابل آشکارسازی نبود. در یک مطالعه، اثر دانه‌های ذرت

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

حاوی ژن *cry*1Ac در جیره غذایی طیور نشان داد که DNA نوترکیب و یا پروتئین CryIAc در دستگاه گوارش پس از هضم باقی نمانده بود. پروتئین CryIAc با ورود به دستگاه گوارش تحت شرایط pH اسیدی به سرعت تخریب می‌شدند. همچنین نشان داده شد که توالی‌های اسیدآمینه‌ای پروتئین CryIAc با هیچ پروتئین سمی دیگری همولوژی ندارند.

تغذیه جوجه‌های بلدرچین (*Colinus virginianus*) با جیره غذایی محتوی ۱۰٪ پنبه‌دانه تراریخته حاوی پروتئین CryIAc به میزان ٤۰۰ دانه به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن پرنده نیز هیچ تفاوت معناداری را در وزن و سایر خصوصیات آنها در مقایسه با جیره حاوی پنبه‌دانه غیرتراریخته نشان نداد (USDA, 1995)

جنبه دیگری که گاهی مورد نظر قرار می‌گیرد آن است که DNA ژن *cry*IAc به عنوان یک ماده ژنتیکی در بدن موجود زنده چه سرنوشتی پیدا می‌کند. ورود DNA نوترکیب به دستگاه گوارش منوط به مصرف بافت گیاه مطرح بوده و در این صورت مسلماً تنها برای احشام مطرح می‌گردد. این DNA (که خود غیرسمی است) در محیط اسیدی معده به قطعاتی کوچکتر از bp ۲۰۰ و غیرقابل رمز شدن می‌شکند و بعدها توسط آنزیم‌های درون یا برون سلولی کاملاً تجزیه می‌شوند. ایجاد آلرژی توسط DNA نوترکیب در این شرایط محتمل نیست.

وضعیت زیست‌محیطی پروتئین CryIAc

در بررسی محیط‌زیستی وزارت کشاورزی آمریکا روی پروتئین‌های Cry، تاثیر معنی‌داری برای ماندگاری پروتئین CryIAc در طبیعت مشاهده نگردید (USDA, 1995). در این بررسی‌ها کریستال‌های پروتئینی CryIAc در مزرعه و تحت تشعشعات خورشید و گرما بسهولت تخریب می‌شدند (Palm *et al.* 1993; 1994; 1996).

سرنوشت پروتئین خالص CryIAc در محیط زیست بطور مفصل نیز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده است که جذب پروتئین CryIAc توسط خاک در مدت ۳۰ دقیقه به طور سریع و کامل صورت می‌گیرد (Venkateswerlu and Stotzky, 1992). مطالعات زیاد دیگری هم درباره تخریب زیستی و اتصال پروتئین‌های CryIAc در خاک انجام شده است که در این میان می‌توان به گزارش تپ و همکاران، (Tapp *et al.* 1994)، تپ و استوزکی (Tapp and Stotzky, 1995; 1998)، کرچیو و استوزکی (Crecchio and Stotzky, 1998)، کاسکلا و استوزکی (Koskella and Stotzky, 1997) اشاره کرد. این مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین‌های CryIAc، توانایی اتصال به ذرات رس و هیومیک اسید در مخلوط‌های مصنوعی خاک را دارند.

در یک آزمایش دیگر مقادیر پروتئین CryIAc در کل گیاه بالغ بدست آمده از مزرعه در پایان فصل زراعی در اندازه‌گیری شده است. این داده‌ها برای ارزیابی مقدار پروتئین CryIAc که ممکن است پس از برداشت و در اثر برگرداندن باقیمانده گیاهان به داخل خاک وارد محیط‌زیست شود، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در طی یک بررسی دوساله مقدار پروتئین CryIAc وارد شده به خاک، به ترتیب حدود ۳/٥٦ و ۱/٤۸ گرم بر هکتار بود. بر اساس این مقادیر، مطالعه بر روی تخریب پروتئین CryIAc در خاک در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از فعالیت حشره‌کشی آن برای اندازه‌گیری میزان تخریب پروتئین انجام شد. این مطالعه نشان داد پروتئین CryIAc هم بصورت خالص و هم به صورت بخشی از بافت گیاهی پنبه به سرعت در خاک تخریب می‌شود. نیمه‌عمر پروتئین CryIAc در بافت گیاهی ٤۱ روز بدست آمد که با نرخ تخریب گزارش شده برای فرمولاسیون‌های میکروبی *B.t.* قابل مقایسه است (Betz *et al.* 2000). نیمه‌عمر برای پروتئین خالص شده کمتر از ۲۰ روز بود. این مقادیر مشابه نرخ‌های گزارش شده توسط پالم و همکاران (Palm *et al.* 1993; 1994; 1996) برای گیاهان تراریخته تولید کننده پروتئین‌های Cry است.

همانطور که پیش از این بیان شد، استفاده از ژن و پروتئین CryIAc در مهندسی ژنتیک و تولید محصولات تراریخته منوط به احراز موثربودن آن در ایجاد صفت مورد نظر و در ادامه، احراز عدم سمیت برای انسان و دام و نیز عدم فعالیت حساسیت‌زایی برای انسان است. در نهایت جنبه‌های زیست‌محیطی آن نیز اهمیت می‌یابد.

در این بررسی با بیان مکانسیم مولکولی دقیق عملکرد پروتئین CryIAc، نشان داده شد که عملکرد این پروتئین در ایجاد صفت

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

مورد نظر یعنی اثر بر آفات پروانه‌ای بسیار اختصاصی است. این عملکرد اختصاصی باعث می‌شود که پروتئین حتی برای سایر حشرات آفت نیز غیر سمّی و بی‌تأثیر باشد. به صورت نظری، این وضعیت به معنای عدم وجود هر گونه مشکل در مصرف این پروتئین خواهد بود. با این وجود، تأیید این نظریه نیازمند انجام آزمایش و به دست آوردن داده‌های تجربی است.

آزمایش‌های انجام‌شده با استفاده از پروتئین خالص CryIAc نشان داد که این پروتئین به آسانی در شیره معده هضم شده و از بین خواهد رفت. این نتیجه حاکی از رفتار عادی این پروتئین و عدم ایجاد مشکل در دستگاه گوارش است. علاوه بر این، افزودن این پروتئین به صورت خالص به جیره غذایی موجودات مختلف نشان داد که هیچ گونه تغییری در فاکتورهای مرتبط با رشد و نیز پارامترهای خونی و آنزیمی موجودات آزمایشگاهی به وجود نمی‌آید. مطالعات هیستوشیمیایی خون نیز هیچ گونه تحریک سیستم ایمنی یا آثار سوء مرتبط با وجود این پروتئین در خون را نشان نمی‌دهد.

بررسی‌های *این-سیلیکو* در این مطالعه نشان دادند که پروتئین CryIAc هیچ گونه تشابهی با پروتئین‌های سمّی شناخته‌شده ندارند. آنالیز قطعات ۸۰ اسیدآمینه‌ای این پروتئین نیز تشابهی با پروتئین‌های شناخته‌شده سمی و یا آلرژن ندارد. آنالیز قطعات ۸ اسیدآمینه‌ای پروتئین CryIAc نیز نشان داد که تشابهی با اپی‌ژن‌های شناخته‌شده آلرژن ندارد. از این رو، انتظار نمی‌رود که در آزمایش‌های بالینی غذاهای حاوی این پروتئین، سمّیّت یا حساسیت‌زایی خاصی مشاهده شود. شواهد تجربی این نتیجه را تأیید کردند.

آزمایش‌های مرتبط با غذای کامل حاوی پروتئین CryIAc در موجودات مختلف اعم از موش صحرایی، خرگوش، بلدرچین، گاو و نیز ماکیان دیگر در دوره‌های زمانی مختلف نیز نشان دادند که این غذاها در مقایسه با معادل غیرتراریخته و بدون پروتئین CryIAc هیچ گونه تغییری به وجود نمی‌آورند و تمام عوامل رشدی و تولیدی دو گروه تغذیه‌ای مورد مطالعه یکسان هستند. این نتایج نیز حاکی از ایمنی کامل پروتئین CryIAc برای انسان و دام است.

در نهایت بررسی‌ها نشان داده‌اند که پروتئین CryIAc چه به صورت خالص و چه به صورت موجود در بافت گیاهی، در خاک به سرعت جذب ذرات رس شده و از بین می‌رود. هم چنین نشان داده شده است که تجزیه بافت گیاهی حاوی این پروتئین در خاک به همان صورت و سرعتی انجام می‌شود که سایر بافت‌های گیاهی مورد تجزیه قرار می‌گیرند. این نتایج حاکی از عدم پایداری این پروتئین در محیط بوده و نشاندهنده‌ی ایمنی این پروتئین برای محیط زیست است.

این بررسی‌ها در مجموع نشان از ایمنی کامل پروتئین و ژن *cry*IAc برای استفاده در فرایندهای مهندسی ژنتیک هستند. بیش از پنج دهه استفاده ایمن از فرمولاسیون‌های میکروبی حاوی این پروتئین نیز دلیل دیگری بر این مدعاست.

منابع

Astwood JD, Fuchs RL. 1996. Food allergens are stable to digestion in a simple model of the gastrointestinal tract. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 97: 241.

Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nature Biotechnology, 14: 1269-1273.

Betz FS, Hammond BG Fuchs RL. 2000. Safety and advantages of Bacillus thuringiensis-protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 32: 156-173.

Castillo AR, Gallardo MR, Maciel M, Giordano JM, Conti GA, Gaggiotti MC, Quaino O, Gianni C, and Hartnell GF. 2001. Effect of feeding dairy cows with either Bollgard, BollgardII, Roundup Ready or control cottonseeds on feed intake, milk yield and milk composition. J. Dairy Sci., 84 (1) Abstract 1712.

Crecchio C, Stotzky G. 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki bound to humic acids from soil. Soil Bio. Biochem. 30: 463-470.

Doolittle RF, Feng DF, Anderson KL, Alberro MR. 1990. A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. J. Molecular Evolution, 31: 383-388.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]

Fuchs RL Astwood JD. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. Food Technology 50: 83-88.

Harvey L, Arnold B, Chris K, Monte K, Anthony B, Hidde P, Angelika A. 2013. Molecular Cell Biology (Seventh ed.). New York: Worth Publ. p 934.

Hofmann C, Lüthy P, Hutter R, Pliska V. 1988. Binding of the delta endotoxin from Bacillus thuringiensis to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly, Eur J Biochem. 173(1): 85-91.

Kimber I, Kerkvliet NI, Taylor SL, Astwood JD, Sarlo K, Dearman RJ. 1999. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. Toxicological Sciences, 48: 157-162.

Koskella J, Stotzky G. 1997. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from Bacillus thuringiensis and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. Appl. Environ. Microbiol. 63(9):3561-3568.

McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of Bacillus thuringiensis-based pesticides. Pestic. Sci. 45: **95-105.**

Metcalfe DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson HA, Taylor SL, Fuchs RL. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36(S):S165- S186.

OECD. 1995. OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948386.pdf.

Offermanns S, Rosenthal W. 2008. Encyclopedia of Molecular Pharmacology. Springer. pp. 306

Palm CJ, Donegan KK, Harris D, Seidler RJ. 1994. Quantification in soil of Bacillus thuringiensis var. kurstaki delta-endotoxin from transgenic plants. Mol. Ecol. 3: 145-151.

Palm CJ, Schaller DL, Donegan KK, Seidler RJ. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced Bacillus thuringiensis var. kurstaki delta-endotoxin. Can. J. Microbiol. 42: 1258-1262.

Palm CJ, Seidler RJ, Donegan KK, Harris D. 1993. Transgenic plant pesticides: Fate and Persistence in soil. Plant Physiol. Suppl 102: 166.

Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A. 2013. Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev, 37: 3–22.

Rahman M, Zaman M, Zafar Y, Hayder Z, Jamil A, Kikuchi A, Watanabe KN. 2015. Mammalian Food Safety Risk Assessment of Transgenic Cotton Containing Cry1Ac Gene Conducted Independently in Pakistan. Med Safe Glo Heal. 4: 2-8.

Shahid AA, Bano S, Khalid S, Samiullah TR, Bajwa KS, Ali MA. 2016. Biosafety assessment of transgenic Bt cotton on model animals. Adv. life sci., 3:97-108.

Sjoblad RD, McClintock JT, Engler R. 1992. Toxicological considerations forprotein components of biological pesticide products. Regulatory Toxocology and Pharmacology, 15: 3-9.

Stefkova K, Prochazkova J, Pachernik J. 2015. Alkaline Phosphatase in Stem Cells. Stem Cells International. 2015: 1-11.

Tabashnik BE, Zhang M, Fabrick JF, Wu Y, Gao M, Huang F, Wei J, Zhang J, Yelich A, Unnithan GC, Bravo A, Soberón M, Carrière Y, Li X. 2015. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Sci. Rep.* 5, 15107

Tapp H, Calamai L, Stotzky G. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki and subsp. tenebrionis on clay minerals. Soil Biol Biochem. 26:663-679.

Tapp H, Stotzky G. 1995. Insecticidal activity of the toxins from Bacillus thuriengiensis subsp. kurstaki and tenebrionis adsorbed and bound on pure and soil clays. Appl. Environ. Microbiol. 61(5):1786-1790.

Tapp H, Stotzky G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from Bacillus thuriengiensis subsp. kurstaki in soil. Soil Biol. Biochem. 30: 471-476.

Taylor A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. FASEB J. 7(2): 290-298.

Taylor SL, Lemanske Jr RF, Bush RK, Busse WW. 1987. Food allergens: structure and immunologic properties. Ann. Allergy 59(5): 93-99.

Taylor SL. 1992. Chemistry and detection of food allergens. Food Technology 46: 146-152.

US FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Federal Register 57(104):22984-23005.

USDA. 1995. Availability of Determination of Non-regulated status for genetically engineered cotton. Federal Register 60(134):36096-36097.

Venkateswerlu G, Stotzky G. 1992. Binding of the protoxin and toxin proteins of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki on clay minerals. Current Microbiol. 25: 225-233.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.1.3]