

ردیابی ژن *nptII* و پیشبر *nos* در دستگاه گوارش و بافت‌های موش‌های صحرائی تغذیه‌شده با سیب‌زمینی تراریخته

Detection of *nptII* gene and *nos* promoter in digestive system and tissues of rat, fed genetically modified potato

علیرضا ستارزاده^۱، حسن رهنما^{۲*}، مهدی نیکمرد^۳، بهزاد قره‌یاضی^۴، محمود

خسروشاهلی^۵

Alireza Sattarzadeh¹, HassanRahnama^{2*}, Mahdi nikmard³, Behzad Ghareyazie⁴,
Mahmoud Khosrovchahli⁵

۱، ۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۱، ۳ و ۵- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

1, 2, 4-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran(ABRII)

1,3,5- Azad university science and research center of Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

پیشبر *nos*
دستگاه گوارش
دی.ان.ای نوترکیب
ژن *nptII*
سیب‌زمینی تراریخته

استفاده از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در گیاهان تراریخته منجر به ملاحظاتی در مصرف‌کنندگان در رابطه با احتمال انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به میکروارگانیسم‌های داخلی بدن، دستگاه گوارش و احتمال جذب آنها شده است. بررسی میزان ثبات و تجزیه‌پذیری پروتئین یا ژن مورد نظر در طی مراحل هضم، می‌تواند تگرانی مربوط به سمیت یا حساسیت‌زایی آن را به حداقل برساند. برای بررسی میزان پایداری و وجود قطعات دی.ان.ای نوترکیب سیب‌زمینی تراریخته در دستگاه گوارش و احتمال جذب آن‌ها، از مدل حیوانی موش صحرائی استفاده شد. پس از اتمام یک دوره خوراک‌دهی ۹۰ روزه موش‌های صحرائی، نمونه‌هایی از محتوای دستگاه گوارش، بافت‌های دستگاه گوارش، خون و سایر بافت‌ها برداشته شد. پس از استخراج دی.ان.ای و بررسی کمیت و کیفیت آن، اقدام به شناسایی و ردیابی قطعات مختلف تراژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعات داخل ژنی شد. براساس نتایج بدست آمده، ژن شاهد که شامل قطعات ژن کلروپلاستی *cp* در خوراک استفاده شده بعنوان غذا و محتویات دستگاه گوارش و قطعات ژن داخلی موش *my* به عنوان کنترل داخلی بافت‌های موش، در هر دو گروه از موش‌های تغذیه‌شده با سیب‌زمینی تراریخته و غیرتراریخته شناسایی شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای پیشبر *nos* و ژن *nptII* و در تعدادی از نمونه‌های محتویات دستگاه گوارش گروه‌های تغذیه‌شده با سیب‌زمینی تراریخته مثبت بود و در نمونه مربوط به بافت‌ها و خون و گروه کنترل هیچ قطعه‌ای مشاهده نشد. نتایج این پژوهش نشان داد قطعات ژن داخلی سیب‌زمینی و مولکول دی.ان.ای تراژن در دستگاه گوارش بطور کامل تخریب نشده و قطعاتی از آن در دستگاه گوارش قابل تشخیص است. آنچه مسلم است دی.ان.ای موجود در یک ماده غذایی و یا دی.ان.ای منتقل شده (تراژن) در دستگاه گوارش ساختار یکسانی دارند. بنابراین، حضور قطعاتی از این ژن‌ها در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش موش طبیعی است.

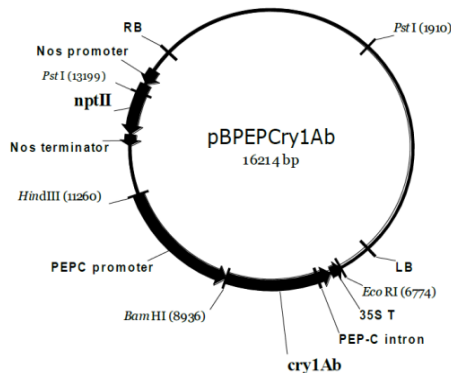
مقدمه

بیفتند. پژوهش در زمینه انتقال ژن *nptII* و سایر ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک مشخص کرد که انتقال یک ژن نشانگر از یک گیاه تراریخته به باکتری خاک که قبلاً واجد آن ژن نبوده‌اند، بسیار بعید است. حتی وقتی که یک باکتری خاکزی حساس به کانامایسین، ژن *nptII* حاصل از گیاه را دریافت می‌کند پخش صفت جدید در جمعیت باکتریایی بستگی به قدرت رقابتی سلول‌های تراریخته دارد. چون وجود کانامایسین در خاک‌های طبیعی هنوز شناسایی نشده است (Nielsen et al., 2000). نتیجه گرفته شده است که شرایط طبیعی خاک به ندرت فشار انتخابی لازم برای اثبات انتقال احتمالی ژن *nptII* از گیاهان تراریخته به باکتری‌های پذیرنده را فراهم می‌کند. از طرف دیگر، باکتری‌های مقاوم به کانامایسین به فراوانی در خاک‌های طبیعی وجود دارند. برای مثال، DeVries و همکاران (۱۹۹۸) دی.ان.ای استخراج شده از چهار نمونه خاک از مزارع مختلف را بررسی کرده و نشان دادند که هر چهار نمونه خاک واجد دی.ان.ای بودند که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *nptII* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر پیدا می‌کنند. غلظت توالی‌های *nptII* هدف بین 2×10^5 تا 3×10^8 مولکول بر گرم خاک (وزن خشک) متفاوت بود. بنابراین، تحت بهترین شرایط فرضی، نمونه‌های خاکزی تراریخته مقاوم به کانامایسین که در نتیجه جذب دی.ان.ای از گیاه تراریخته ایجاد می‌شوند $1:10000000$ جمعیت‌های خاکزی مقاوم به کانامایسین را هم تشکیل نخواهند داد (Rahnama et al., 2011). در این پژوهش تلاش شده است تا با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، وجود قطعات دی.ان.ای تراژن *nptII* و پیشبر *nos* در محتویات دستگاه گوارش و همچنین بافت‌های مختلف موش‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این پژوهش را می‌توان به مراکز مسئول صدور مجوز رهاسازی ارائه کرد و به کمک این اطلاعات در مورد امکان به زیر کشت بردن تجاری سیب‌زمینی تراریخته تصمیم‌گیری کرد. با توجه به نتایج این بررسی تا حدودی به ملاحظه‌ها و تردیدها در مورد استفاده از محصولات تراریخته پاسخ داده خواهد شد.

تراژن‌های موجود در گیاهان تراریخته در بیشتر موارد دارای توالی‌های پروکاریوتی هستند از جمله ملاحظه‌های موجود در این زمینه امکان انتقال این تراژن‌ها از گیاهان تراریخته به باکتری‌ها و یا میکروب‌های موجود در دستگاه گوارش انسان و حیوانات است. یکی از مهم‌ترین ملاحظه‌ها این است که ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک استفاده شده در تولید گیاهان تراریخته ممکن است وارد باکتری‌های بیماری‌زای موجود در دستگاه گوارش شوند (Folmer et al., 2000). بدین منظور ضروری است پس از تولید یک محصول تراریخته، سلامت غذایی آن از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد. ژن *nptII* فراوان‌ترین ژن نشانگر انتخابی استفاده شده در گیاهان تراریخته جهت اهداف پژوهشی است (Ziemienowicz et al., 2001). بررسی‌های انجام شده در بخشی از مقالات منتشر شده نشان داده که در ۷۷-۴۴ درصد از پژوهش‌هایی که از گیاهان تراریخته استفاده کرده‌اند، گیاهان مورد بررسی واجد ژن نشانگر انتخابی *nptII* بوده‌اند (Rahnama et al., 2011). آژانس‌های نظارتی بین‌المللی، آزادسازی تجاری کلزا، ذرت، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، گیاه کتان، کاسنی و پنبه حاوی ژن *nptII* را پذیرفته‌اند. هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر اثرهای سوء NPTII یا ژن *nptII* بر انسان، جانوران یا محیط گزارش نشده است (Rahnam et al., 2004; Miki et al. 2004) در بررسی‌های انجام شده بر روی باکتری‌های خاکزی در مزارع زیر کشت گیاهان تراریخته واجد ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، هیچ‌گونه باکتری تراریخته‌ای مشاهده نشده است (De Vries et al., 1998). بعلاوه، گروه‌های پژوهشی زیادی هم نتوانسته‌اند در شرایط آزمایشگاهی، انتقال افقی ژن را از گیاهان تراریخته به باکتری‌ها نشان دهند. با این وجود، ثابت شده است که باکتری‌هایی که دارای بخش‌هایی از ژن *nptII* هستند می‌توانند در نتیجه نوترکیبی با ژن‌های همسان خود (NPTII) در گیاه تراریخته، ژن خارجی گیاهی را دریافت کنند (Rahnama et al., 2011; Van den Eede et al., 2004). داده‌های اخیر مشخص کرده‌اند که انتقال ژن از گیاهان تراریخته به باکتری‌های خاک می‌تواند در شرایط طبیعی (حداقل وقتی که توالی‌های همسان مشخصی بین ژن خارجی و دی.ان.ای سلول پذیرنده وجود داشته باشد) اتفاق

مواد و روش‌ها

خوراک‌دهی ۹۰ روزه، پس از ۱۲ ساعت از قطع غذا یا خوراک، سلاخی و کشتار موش‌ها انجام شد؛ در دستگاه گوارش از محتویات معده، محتویات سکوم، محتویات روده، و بافت‌های دوازدهه، ژوژنوم، دودنوم، ریه، کبد، معده، قلب، کلیه، طحال، بیضه، مغز و خون بصورت جداگانه نمونه‌گیری شد و نمونه‌ها در فریزر و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ژن نشانگر *nptII* در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش، بافت‌ها و خون مورد پیگیری قرار گرفت. برای تهیه دی.ان.ای مورد نیاز از بافت‌ها و نمونه‌های مختلف برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از کیت‌های استخراج دی.ان.ای Qiagen استفاده شد. غلظت دی.ان.ای مورد استفاده ۷۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جهت حصول اطمینان از تراریخته بودن سبب زمینی مورد استفاده به‌عنوان خوراک در تغذیه موش‌ها با آغازگرهای اختصاصی (*cp* و *my*) ضروری است، بدین منظور پس از استخراج دی.ان.ای، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگر اختصاصی قطعات ژن‌های استفاده شده در تولید سبب زمینی تراریخته، شامل پیشبر *nos* و ژن *nptII* انجام شد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۱- نقشه‌ی ناقل دوگانه pBPECCry1Ab حاوی ژن *cry1Ab* تحت کنترل پیشبر PEPC، پیشبر *nos* و نشانگر انتخابی *nptII*

Figure 1- Map of pBPECCry1Ab vector containing *cry1Ab* gene under PEPC promoter, *nos* promoter, and *nptII* selectable marker gene.

آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژن: به منظور بررسی الگوی بیان اعضای مختلف خانواده ژنی، طراحی

خصوصیات سازه ژنی استفاده شده در تولید سبب زمینی تراریخته: در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- کرج، سبب زمینی تراریخته مقاوم به بید سبب زمینی با استفاده از ژن *cry1Ab* تولید شده است. برای هدفمند کردن بیان ژن‌ها و تولید سبب زمینی Bt ایمن‌تر از نظر رعایت اصول ایمنی زیستی، از پیشبر (*Phosphoenolpyruvate carboxylase*) PEPC گیاه ذرت (*Zea mays*) که سبب تظاهر ژن در بخش‌های سبز گیاه می‌شود، استفاده شده است (Ghasimi et al., 2009). برای انتقال سازه مولکولی pBPECCry1Ab به گیاه سبب زمینی از آگروباکتیوم *tomofasinsis* سویه AGLo1 استفاده شد (شکل ۱). این سازه ژنی دارای ژن نشانگر *nptII* و از پیشبر *NOS* است.

رژیم غذایی، گروه‌های آزمایشی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: سبب زمینی‌های کنترل و تراریخته پس از کشت در شرایط گلخانه‌ای به مرحله غده‌دهی رفتند. سبب زمینی‌ها پس از خشک‌کردن، به شکل پودر در جیره غذایی موش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. از آنجا که سبب زمینی و فراورده‌های آن به وفور در سبد غذایی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد بنابراین در این پژوهش از مدل موش صحرایی به دلیل مشابهت بسیار زیاد دستگاه گوارش با انسان نسبت به سایر حیوانات آزمایشگاهی و مزرعه‌ای موجود در ایران استفاده شد. برای انجام این آزمایش از ۱۶ موش صحرایی (۸ موش نر و ۸ موش ماده) استفاده شد. موش‌ها به چهار گروه ۴ تایی تقسیم شدند. هر یک از این دسته‌ای ۴ تایی تحت عنوان یک تیمار بودند که در هر تیمار از ۲ موش نر و دو موش ماده استفاده شد. در ۲ گروه از موش‌ها علاوه بر جیره غذایی معمولی موش (شامل پودر گندم، پودر جو، پودر ذرت، سبوس گندم، بلغور سویا، پودر برسیم، پودر یونجه، مولتی ویتامین، ویتامین C، ویتامین D3، ویتامین E، پودر شیر و بلغور گوشت) ۳۰ درصد سبب زمینی تراریخته و در دو گروه دوم علاوه بر جیره غذایی معمولی موش، از سبب زمینی غیرتراریخته استفاده شد. در دو گروه از گروه‌های چهارتایی از سبب زمینی نوردیده و در دو گروه دیگر از سبب زمینی‌های قرار گرفته در شرایط تاریکی استفاده شد. شرایط نگهداری موش‌ها براساس دستورالعمل OECD بود (OECD, 1998). پس از اتمام یک دوره

قطعات ژن داخلی موش به عنوان کنترل داخلی *my* (جدول ۱)، تهیه شد. کنترل مثبت در این آزمایش به یک ژن با تعداد نسخه بالا گفته می‌شود که بتوان به سادگی در قسمت‌های مختلف مورد ردیابی قرار گیرد انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت تشخیص قطعه ژن *nptII* و پیشبر *nos* با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲ و ۳) پس از استخراج دی.ان.ای از بافت‌های ذکر شده انجام شد (شکل ۴، ۵ و ۶؛ جدول ۴). ترکیب محلول واکنش در جدول ۳ و

آغازگرها به گونه‌ای صورت گرفت که با استفاده از هر جفت آغازگر تنها عضو مورد نظر به‌طور اختصاصی تکثیر شود. به این منظور از طریق هم‌ردیف کردن توالی‌های گزارش شده برای هر ژن مورد نظر در بانک ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information) جفت آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار OLIGO ver 5 طراحی شد. یک جفت آغازگر برای کنترل مثبت که شامل قطعات ژن کلروپلاستی *cp* و

جدول ۱- فهرست جفت آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژن‌های اختصاصی و کنترل.

Table 1- Names and sequences of the primer pair used for determine gene expression especially and control.

نام آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequence of primer	طول محصول PCR (bp) Length of PCR product
Pot-cp-F Pot-cp-R	5'- CTC TTT ACA TCG AAA CTT CAG AAA G-3' 5'- AAA CTA CGG ATT CGG GTC G-3'	111 bp
F-nptII R-nptII	5' GCT ATT CGG CTA TGA CTG GGC AC 3' 5' TCA TCC TGA TCG ACA AGA CCG GC 3'	400 bp
MY-F 5 MY-R 5	5'- TTG TGC AAA TCC TGA GAC TCA T-3' 5'- ATA CCA GTG CCT GGG TTC AT-3'	100 bp
R-Nos P F-Nos P	5' AGG TGC AGA TTA TTT GGA TTG AGA GTG 3' 5' TCA TGA GCG GAG AAT TAA GGG AG 3'	300 bp

جدول ۲- زمان و دمای استفاده شده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای آغازگرهای اختصاصی و کنترل داخلی.

Table 2- Time and annealing temperature primers specific used in the polymerase chain reaction.

آغازگر Primer	واسرشت سازی اولیه Initial denaturation (min)	واسرشت سازی Denaturation (sec)	اتصال آغازگر Annealing (sec)	گسترش Extension (sec)	تعداد چرخه Cycle	گسترش نهایی Final elongation (min)
Pot-cp	4 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C
nptII	5 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C
MY	5 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C
Nos	4 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C

استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به غیر از دی.ان.ای ژنومی) تهیه شد. سپس محلول مادری در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری تقسیم و با دی.ان.ای ژنومی و آغازگرها به خوبی مخلوط شد و

زمان و دمای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در جدول ۲ ذکر شده است. محلول مادری با در نظر گرفتن مواد مشترک بین واکنش‌های مورد نظر به همراه کنترل منفی (تمام مواد مورد

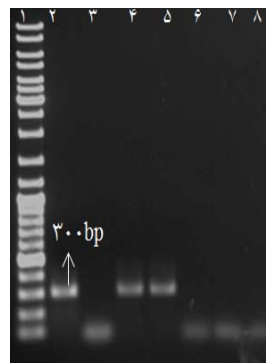
شکل ۳ نشان داده شده است، باندهای حاصل از تکثیر مشاهده شده با اندازه ۴۰۰ جفت باز مربوط به کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیب‌زمینی تراریخته است، کنترل منفی و سیب‌زمینی غیرتراریخته و شاهد هیچ‌گونه باندهای نشان نمی‌دهند. همانطور که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است، باندهای حاصل از تکثیر مشاهده شده با آغازگر اختصاصی ژن‌های استفاده شده در تولید سیب‌زمینی تراریخته بیانگر تراریخته بودن سیب‌زمینی مورد استفاده به عنوان خوراک در تغذیه موش‌هاست.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تشخیص ژن *nptII* نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن *nptII* در تعدادی از نمونه‌های دستگاه گوارش موش‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته مثبت بود و در نمونه مربوط به بافت‌ها و خون و گروه کنترل هیچ قطعه‌ای مشاهده نشد (شکل‌های ۴ و ۵؛ جدول ۴).

پس از اسپین در دستگاه PCR BIO-RAD قرار گرفت. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد برده شد و توسط دستگاه Gel-Doc عکسبرداری صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثبات تراریخته بودن سیب‌زمینی استفاده شده بعنوان خوراک تشخیص پیشبر *nos* در سیب‌زمینی تراریخته: همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، باندهای حاصل از تکثیر مشاهده شده با اندازه ۳۰۰ جفت باز مربوط به کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیب‌زمینی تراریخته است، که نشان دهنده تراریخته بودن سیب‌زمینی است؛ کنترل منفی و سیب‌زمینی غیرتراریخته و شاهد هیچ‌گونه باندهای نشان نمی‌دهند. **تشخیص ژن *nptII* در سیب‌زمینی تراریخته:** همانطور که در



شکل ۲- تشخیص پیشبر *nos* در سیب‌زمینی تراریخته با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

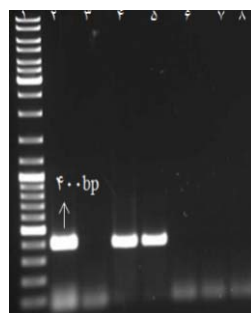
Figure 2- Detection of *nos* promoter in genetically modified potato by PCR reaction.

شماره‌گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱، نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder)؛ ۲، پلاسمید نو ترکیب حاوی پیشبر *nos* ۳، کنترل منفی (آب)؛ ۴، غذای محتوی سیب‌زمینی تراریخته نور؛ ۵، سیب‌زمینی تراریخته؛ ۶، غذای فاقد سیب‌زمینی؛ ۷، سیب‌زمینی غیرتراریخته؛ ۸، غذای محتوی سیب‌زمینی غیرتراریخته.

Number: 1 Ladder (1Kb Ladder) 2: Recombinant plasmid contained *nos* promoter 3: negative control (water) 4: diet with genetically modified potato (GMP) 5: genetically modified potato (GMP) 6: diet without potato 7: genetically modified potato (NGMP) 8: diet with NGMP

موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته (شکل ۴؛ شماره ۲) نیز تشخیص داده شد. کنترل منفی و نمونه‌های محتویات سکوم سایر موش‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته و غیرتراریخته و گروه شاهد هیچ‌گونه باندهای نشان‌دهنده بیانگر عاری بودن محتویات سکوم نمونه‌های ذکر شده از قطعه ژن *nptII* است. حضور ژن کلروپلاستی *cp* با قطعه تکثیری به اندازه ۱۱۱ جفت

تشخیص قطعه ژن *nptII* در محتویات سکوم: همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، باندهای ۴۰۰ جفت‌بازی حاصل از تکثیر مربوط به ژن *nptII* در نمونه کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیب‌زمینی تراریخته مشاهده می‌شود. همچنین قطعه ژن *nptII* در محتویات سکوم موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته (شکل ۴؛ شماره ۱۵) و محتویات سکوم

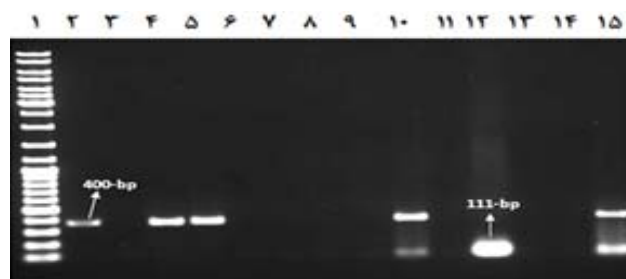


شکل ۳- تشخیص ژن *nptII* در سیب‌زمینی تراریخته با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

Figure 3- Detection of *nptII* gene in the genetically modified potato (GMP) by PCR reaction.

شماره‌گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱: نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder) ۲: پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *nptII* ۳: کنترل منفی (آب)؛ ۴: غذای محتوی سیب‌زمینی تراریخته ۵: سیب‌زمینی تراریخته ۶: سیب‌زمینی غیر تراریخته ۷: غذای محتوی سیب‌زمینی غیر تراریخته ۸: غذای فاقد سیب‌زمینی.

Number: 1 (1Kb Ladder) 2: Recombinant plasmid contained *nos* 3: negative control (water) 4: diet with genetically modified potato (GMP) 5: GMP6: NGMP 7: diet with NGMP 8: diet without potato

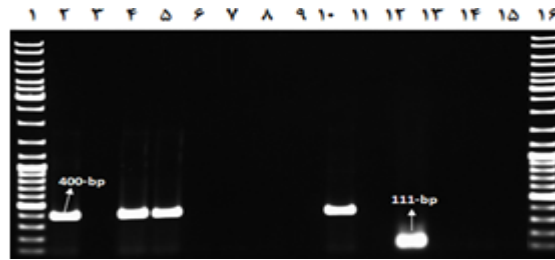


شکل ۴- تشخیص قطعه ژن کلروپلاستی *cp* و ژن *nptII* در محتویات سکوم.

Figure 4- Detection of potato-specific *cp* gene and *nptII* gene in content of the cecum

شماره‌گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱ (نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder) ۲) موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۳) کنترل منفی (آب) ۴) سیب‌زمینی تراریخته ۵) خوراک سیب‌زمینی تراریخته ۶) سیب‌زمینی شاهد ۷) خوراک سیب‌زمینی غیر تراریخته ۸) موش نر تغذیه شده خوراک سیب‌زمینی غیر تراریخته ۹) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۰) پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *nptII* ۱۱) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۲) کنترل مثبت (ژن کلروپلاستی *cp*) در محتویات سکوم موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی غیر تراریخته ۱۳) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۴) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۵) موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته.

Line numbers: 1 (1Kb Ladder) 2: male rats were fed diet GMP 3: control without DNA 4: GMP 5: diet with GMP 6: control diet without potato 7: diet with NGMP 8: male rats were fed diet NGMP 9: female rats fed GMP 10: Recombinant plasmid harboring *nos* gene 11: female rats fed with diet GMP 12: positive control (chloroplast *cp* gene) content of the cecum male rats fed diet NGMP 13: female rats fed diet GMP 14: female rats fed diet GMP 15: male rats fed diet GMP



شکل ۵- تشخیص قطعه ژن کلروپلاستی *cp* و ژن *nptII* در محتویات معده.

Figure 5- Detection of potato-specific primer CP and *nptII* gene in content of the Stomach.

شماره گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱ و ۱۶: نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder): ۲: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۳: کنترل منفی (آب) ۴: سیب زمینی تراریخته ۵: خوراک سیب زمینی تراریخته ۶: سیب زمینی شاهد ۷: سیب زمینی غیرتراریخته ۸: موش ماده سیب زمینی غیرتراریخته ۹: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۰: پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *nptII* ۱۱: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۲: کنترل مثبت (ژن کلروپلاستی *cp*) در محتویات معده موش نر تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۳: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۴: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۵: موش نر تغذیه شده با سیب زمینی غیرتراریخته.

Line numbers: 1 and 16 (1Kb Ladder) 2: female rats were fed with diet GMP diet 3: control without DNA 4: GMP 5: diet with GMP 6: control diet without potato 7: NGMP 8: diet with NGMP 9: female rats fed with diet GMP 10: Recombinant plasmid harboring *nos* gene 11: female rats fed with diet GMP 12: positive control (chloroplast *cp* gene) contents of the stomach male rats fed GMP diet 13: female rats fed GMP diet 14: female rats fed GMP diet 15: male rats fed diet NGMP.

در نمونه مربوط به بافت‌ها و خون و گروه شاهد هیچ قطعه‌ای مشاهده نشد (شکل ۶ و جدول ۴).

تشخیص پیشبر *nos* در محتویات معده: همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است، باندهای ۳۰۰ جفت‌بازی حاصل از تکثیر مربوط به پیشبر *nos* در کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیب زمینی تراریخته مشاهده می‌شود. همچنین قطعه پیشبر *nos* در محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته (شکل ۶؛ شماره ۱۱) و محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته (شکل ۶؛ شماره ۱۶) نیز تشخیص داده شد. کنترل منفی و نمونه‌های محتویات معده سایر موش‌های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته و غیرتراریخته و گروه شاهد هیچ‌گونه باندهای نشان‌دهنده عاری بودن محتویات معده نمونه‌های ذکر شده از قطعه پیشبر *nos* می‌باشد. حضور ژن کلروپلاستی (*cp*) با قطعه تکثیری به اندازه ۱۱۱ جفت باز تنها در محتویات معده برخی از موش‌های تغذیه شده با سیب زمینی مشاهده شد.

با توجه به جدول ۴ نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای پروموتور

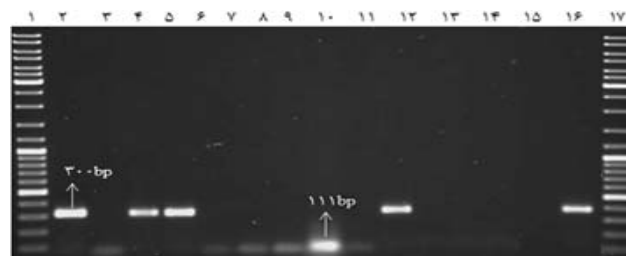
باز تنها در محتویات سکوم برخی از موش‌های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته و غیرتراریخته مشاهده شد.

تشخیص قطعه ژن *nptII* در محتویات معده: همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، باندهای ۴۰۰ جفت‌بازی حاصل از تکثیر ژن *nptII* در کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیب زمینی تراریخته مشاهده می‌شود. همچنین قطعه ژن *nptII* در محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته (شکل ۵؛ شماره ۲) تشخیص داده شد. کنترل منفی و نمونه‌های محتویات معده سایر موش‌های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته و غیرتراریخته و گروه شاهد هیچ‌گونه باندهای نشان‌دهنده عاری بودن محتویات معده نمونه‌های ذکر شده از قطعه ژن *nptII* است. حضور ژن کلروپلاستی *cp* با قطعه تکثیری به اندازه ۱۱۱ جفت باز تنها در محتویات معده برخی از موش‌های تغذیه شده با سیب زمینی مشاهده شد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز *nos* نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای پیشبر *nos* در تعدادی از نمونه‌های دستگاه گوارش موش‌های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته مثبت بود و

نتایج بدست آمده از آزمایش تغذیه جوندگان نشان می‌دهد که دی.ان.ای خارجی در دستگاه گوارش به طور کامل تخریب نشده است. نتایج به دست آمده از پژوهش‌های انجام شده در جوندگان، ماهی، مرغ، خوک، گوسفند، گاو، حیوانات وحشی و انسان نشان می‌دهد که دی.ان.ای مشتق شده از خوراک هم‌چنان به میزان متفاوت و به شکل تکه تکه شده در دستگاه گوارش یافت شده و دستگاه گوارش مانع مطلق در برابر جذب مولکول‌های خارجی پس از خوردن غذا نیست (EFSA, 2009). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در موش‌های جوان انتقال دی.ان.ای به خون صورت نگرفته اما در بخش‌های مختلف محتویات دستگاه گوارش قطعه تراژن یافت شد. بررسی‌های انجام شده در حیوانات مشخص کرد که بیش از ۹۵ درصد دی.ان.ای بعد از عبور از دوازدهه، هیدرولیز شده و بازهای اسیدهای نوکلئیک آن جذب انتروسیت‌ها می‌شوند (Duggan *et al.*, 2000). پژوهش‌های گسترده‌ای در دستگاه گوارش تمام موجودات زنده که در معرض ماکرومولکول‌های موجود در محیط

nos و ژن *nptII* در تعدادی از نمونه‌های دستگاه گوارش گروه‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته مثبت بود و در نمونه مربوط به بافت‌ها و خون و گروه غیرتراریخته هیچ قطعه‌ای مشاهده نشد. در پژوهش حاضر سرنوشت دی.ان.ای تراژن در دستگاه گوارش موش صحرائی بررسی شد و نتایج بدست آمده منطبق و تاییدکننده یافته‌های قبلی در مورد وجود دی.ان.ای خارجی در دستگاه گوارش جوندگان است. نتایج پژوهش حاضر انتقال تراژن از سیب‌زمینی تراریخته به سلول‌های موش، خون و بافت‌ها را نشان نداد. در مقابل قطعه تراژن در بخش‌های مختلف محتویات دستگاه گوارش موش‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته و هم‌چنین توالی غیرتراریخته داخلی در هر دو گروه از موش‌های غیرتراریخته و تغذیه شده با مواد تراریخته تشخیص داده شد. این نتایج با بسیاری از نتایج و پژوهش‌های پیشین تطابق دارد (Hoelweg and Doerfler, 2001., Vijay *et al.*, 2008) (Chowdhury *et al.*, 2003). نتایج پژوهش ارائه شده، همراه با



شکل ۶- تشخیص قطعه ژن کلروپلاستی *cp* و پیشبر *nos* در محتویات معده.

Figure 6- Detection of potato-specific primer CP and promoter *nos* in content of the Stomach.

شماره‌گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱ و ۱۷: نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder) ۲: پلاسمید نو ترکیب حاوی پیشبر *nos* ۳: کنترل منفی (آب) ۴: سیب‌زمینی تراریخته ۵: خوراک سیب‌زمینی تراریخته شاهد ۶: سیب‌زمینی تراریخته ۷: سیب‌زمینی غیرتراریخته ۸: خوراک سیب‌زمینی غیرتراریخته ۹: کنترل مثبت (ژن کلروپلاستی *cp*) در محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۰: موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۱: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۲: موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۳: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۴: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۵: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۶: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته.

Line Numbers: 1 and 19 (1Kb Ladder) 2: Recombinant plasmid agent *nos* promoter 3: control without DNA 4: GMP 5: diet with GMP 6: control diet without potato 7: NGMP 8: diet with NGMP 9: positive control (chloroplast *cp* gene) contents of the stomach female rats fed with GMP diet 10: male rats fed with NGMP diet 11: female rats fed with GMP diet 12: male rats fed with GMP diet 13: female rats fed with NGMP diet 14 female rats fed with NGMP diet 15: female rats fed with NGMP diet 16: female rats fed with GMP diet

جدول ۴- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تشخیص قطعات دی.ان.ای نو ترکیب در دستگاه گوارش و بافت‌های موش‌های صحرایی.

Table 4- Detection of recombinant DNA fragments in gastrointestinal and tissues rats by PCR

	T-M	T-F	N-M	N-F
spleen - طحال	-	-	-	-
brain - مغز	-	-	-	-
duodenum - دوازدهه	-	-	-	-
ileum - ایلئوم	-	-	-	-
jejunum - زوژنوم	-	-	-	-
heart - قلب	-	-	-	-
content cecum - محتویات سکوم	<i>nptII</i>	-	-	-
stomach - معده	-	-	-	-
liver - کبد	-	-	-	-
content stomach - محتویات معده	-	<i>nptII-Nos</i>	-	-
content rectum - محتویات روده	-	<i>nptII-Nos</i>	-	-
ریه	-	-	-	-
blood - خون	-	-	-	-
kidney - کلیه	-	-	-	-

N: موش تغذیه شده با سیب‌زمینی معمولی، T: موش تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته، M: نر، F: ماده.

N: rats fed with diet NGMP T: rats fed with diet GMP M: male F: female

غذا از چند صد جفت باز تا حدود ۱۷۰۰ جفت باز (چندین استثناء) متغیر بود (Schubbert *et al.*, 1994; 1997; 1998; Hohlweg and Doerfler, 2001; Palka *et al.*, 2003) در پژوهش حاضر هیچ قطعه تراژن در نمونه‌های مدفوع گروه‌های آزمایشی تشخیص داده نشد. بنظر می‌رسد دی.ان.ای در طی عبور از سیستم هاضمه موش تخریب شده و قابلیت تشخیص آن کاهش می‌یابد و به انتخاب حد تشخیص قطعه هدف وابسته است. لازم به ذکر است چون مقدار دی.ان.ای نو ترکیب مصرف شده روزانه در مقایسه به میزان کل دی.ان.ای مصرفی بسیار کم است، شناسایی دی.ان.ای خارجی وارد شده به موجود از طریق مواد غذایی، بدلیل توزیع نابرابر دی.ان.ای به روش‌های بسیار حساس نیاز دارد. یکی از دلایل دیگر تغییر در میزان تشخیص دی.ان.ای در پژوهش حاضر نوع نمونه استفاده شده به عنوان خوراک و روش آزمایشی استفاده شده است. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که رژیم غذایی

خارجی هستند صورت گرفته است. بدلیل اینکه پوشش اپیتلیال دستگاه گوارش به طور مداوم در معرض دی.ان.ای خارجی است، این بحث یا سوال پیش می‌آید که تا چه حد این دی.ان.ای در دستگاه گوارش می‌تواند در سلول‌ها گنجانیده شده و یا طی عبور از دستگاه گوارش وارد گردش خون شود (Rahnama *et al.*, 2011). یکی از دلایل تغییر در تشخیص دی.ان.ای پردازش غذا و تخریب دی.ان.ای است. یک گروه پژوهشی سرنوشت دی.ان.ای مصرف شده از منابع مختلف خوراک توسط چونندگان را بررسی کردند و نشان دادند که دی.ان.ای مشتق شده از خوراک به طور کامل در دستگاه روده موش تخریب نمی‌شود. آنها نشان دادند که ۱ تا ۲ درصد دی.ان.ای باکتریوفاژ که به صورت خوراکی مصرف شده بود در مجموعه دستگاه گوارش سالم مانده و در مدفوع تشخیص داده شد. اندازه قطعات دی.ان.ای تشخیصی در نمونه‌های مدفوع در بازه زمانی ۱ الی ۷ ساعت پس از خوردن

دی.ان.ای خوراک مصرف شده به شکل پراکنده در آمده و قابلیت تشخیص آن کاهش یافته، و به انتخاب اندازه قطعه قابل تکثیر وابسته است. همچنین پایداری دی.ان.ای در سیستم هاضمه به مقدار ماده تراریخته مصرف شده، مقدار دی.ان.ای نوترکیب موجود در گیاه تراریخته، فرآوری و مراحل تهیه غذا (که مقدار دی.ان.ای و بنابراین دی.ان.ای نوترکیب را قبل از مصرف کاهش می‌دهد)، مقدار دی.ان.ای آزاد شده از گیاه که در دسترس فلور میکروبی داخلی قرار می‌گیرد و در نهایت به مقدار دی.ان.ای که در طی عبور از دستگاه هاضمه پایدار باقی می‌ماند بستگی دارد. به طور کلی، تشخیص دی.ان.ای خورده شده توسط تعدادی از عوامل، از جمله تعداد نسخه ژن، پردازش غذا، پایداری دی.ان.ای در دستگاه گوارش، میزان قطعه قطعه شدن دی.ان.ای، روش تخریب دی.ان.ای، نوع نمونه، حضور بازدارنده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و حد تشخیص قطعه هدف تحت تاثیر قرار می‌گیرد. تشخیص قطعه دی.ان.ای با تعداد مولکول‌های با تعداد نسخه بالا (به عنوان مثال دی.ان.ای کلروپلاست) در مقایسه با قطعه دی.ان.ای ژن با نسخه کم (به عنوان مثال دی.ان.ای نوترکیب) بیشتر است. این امر منجر به این فرض می‌شود که قطعه دی.ان.ای خارجی در برخی از حیوانات اگر مقدار یا تعداد نسخه اولیه در مواد به اندازه کافی بالا باشد (مانند دی.ان.ای کلروپلاست) قابل شناسایی است. پردازش غذا و تخریب دی.ان.ای در محل جذب نیز، بر میزان تشخیص قطعه دی.ان.ای خارجی اثرگذار است. چون مقدار دی.ان.ای نوترکیب مصرف شده روزانه در مقایسه به میزان کل دی.ان.ای مصرفی بسیار کم است، شناسایی دی.ان.ای خارجی وارد شده به موجود از طریق مواد غذایی، بدلیل توزیع نابرابر دی.ان.ای به روش‌های بسیار حساس نیاز دارد. همه دی.ان.ای، از جمله دی.ان.ای موجود در موجودات تراریخته، از همان چهار نوکلئوتید یکسان تشکیل شده است، به این معنی که استفاده از روش‌های نوترکیب در تولید غذا تغییرات عمده‌ای را در خصوصیات شیمیایی دی.ان.ای ایجاد نمی‌کند. نظر به اینکه، دی.ان.ای تراژن در ساختار متفاوت از دی.ان.ای معمول موجود در سلول‌های حیوان و یا گیاه نیست، تنها تفاوت در ترتیب توالی‌های رونویسی است، پس هیچ دلیلی برای شک کردن به اساس عملکرد دی.ان.ای تراژن با دی.ان.ای

با محتوای فیبر بالا، زمان انتقال مواد غذایی در دستگاه گوارش را کم کرده و دی.ان.ای خارجی به سرعت هضم می‌شود. افزایش میزان چربی یا سلولز در رژیم غذایی تغییری در هضم غذا نشان نمی‌دهد، اما پر بودن معده در تخریب دی.ان.ای اثر گذار بوده است. در حیواناتی که قبل از دریافت دی.ان.ای پلاسمید گرسنه نگه داشته شده بودند، دی.ان.ای با سرعت بیشتری در حال تخریب بود (Palka-Santini *et al.*, 2003). در پژوهش‌های انجام شده توسط Schubert و همکاران (۱۹۹۸) بخش کوچکی از دی.ان.ای خورده شده (کمتر از ۰/۱ درصد) را در جریان خون موش بین ۲ تا ۸ ساعت پس از خوردن غذا و یا در طحال و سلول‌های کبد تا ۲۴ ساعت بعد از تغذیه مشاهده شد. همچنین آنها توانستند پس از خوراندن باکتریوفاژ یا دی.ان.ای پلاسمید به موش باردار، دی.ان.ای خارجی را در جنین و نوزاد حیوانات تشخیص دهند. در یک پژوهش دیگر توسط Hoelweg and Doerfler در سال (۲۰۰۱) روزانه پس از تغذیه میزان مشخصی از دی.ان.ای پلاسمید در موش‌های باردار به مدت ۸ نسل هیچ علائمی از انتقال دی.ان.ای مصرف شده تشخیص داده نشد. همان گروه با انجام یک آزمایش دیگر و تغذیه موش با سویا، قطعه خاص دی.ان.ای گیاهی را در نمونه‌های کبد و طحال تشخیص دادند. همچنین پژوهش‌ها تفاوت در پایداری دی.ان.ای خورده شده بصورت دهانی و یا تزریق داخل وریدی و عضلانی را نشان می‌دهد. پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد زمانی که دی.ان.ای خارجی بصورت داخل وریدی یا عضلانی تزریق شود، قطعاتی از دی.ان.ای خارجی در بافت‌ها و اندام‌های مختلف مانند کبد، کلیه، طحال و عضلات تشخیص داده می‌شود (Nielsen *et al.*, 2004; Tonheim *et al.*, 2007). یافته‌های این پژوهش‌ها، نشان می‌دهد که سلول‌های اپیتلیال دستگاه گوارش به طور معمول در معرض قطعات دی.ان.ای بوده و ممکن است دی.ان.ای به سلول‌های M^۱ در Peyer (یکی از گره‌های سلول‌های لنگاوی) متصل شده و از دیواره روده به داخل رگ‌های جریان خون انتقال و موجب ورود مولکول دی.ان.ای به سلول و بافت‌های مختلف میزبان شود. نتایج این پژوهش و بررسی‌های انجام شده بر روی دی.ان.ای در دستگاه گوارش نشان دهنده این است که بیشتر

گیاهی طبیعی برای مصرف وجود ندارد.

منابع

1. Chowdhury EH, Kuribara H, Hino A, Sultana P, Mikami O, Shimada N, Guruge KS, Saito M and Nakajima Y (2003) Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *Journal of Animal Science* 81:2546-2551.
2. De Vries J and Wackernagel W (1998) Detection of *nptII* kanamycin resistance genes in genomes of transgenic plants by marker rescue transformation. *Molecular and General Genetics*, 257, 606-613.
3. Duggan PS, Chambers PA, Heritage J and Forbes JM (2000) Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiology Letters*, 191, 71-77.
4. EFSA (2009) Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinions on the use of
5. antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*
6. 1108, 1034-1035.
7. Folmer JD, Grant RJ, Milton C T and Beck JF (2000) Effect of Bt corn silage on shortterm lactational performance and ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83 (5):1182 Abstract 272.
8. Ghasimi Hagh Z, Rahnama H, Panahandeh J, Baghban Koneh Rouz B, Arab Jafari KM and Mahna N (2009) Green-tissue-specific, C(4)-PEPC-promoter-driven expression of Cry1Ab makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea operculella*, Zeller) *Plant Cell Rep.* 2010 Jan;29(1):111.
9. Hohlweg U and Doerfler W (2001) On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol. Genet. Genomics* 265, 225-233.
10. Kawabata K, Takakura Y, Hashida M (1995) The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 12:825-830.
11. Miki B and S McHugh (2004) Selection marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* 170: 193-232.
12. Nielsen K M, van Elsas J D and Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp strain BD413 (pFG4 Delta *nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of anamycin on selection of transformants. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1237-1242.
13. Nielsen KM and Townsend JP (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat Biotechnol.* 22: 1110-1104.
14. OECD (1998) OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 408, Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Paris, France.
15. Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hösel M, Renz D, Auerochs S, Brondke H and Doerfler W (2003) The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 270: 210-215.
16. Rahnama H, Maly Amir R, Salehi Jozani G, (2011) Plant genetic engineering and Selectable markers. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran's Press. (In Farsi with English abstract)
17. Rahnama H (2004) biosafety selection markers food safety. The first national conference of - Karaj. (In Farsi with English abstract)
18. Schubbert R, Hohlweg U, Renz D and Doerfler W (1998) On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol. Gen. Genet* 259:569-576
19. Tonheim TC, Leirvik J, Lovoll M, Myhr AI, Bogwald J and Dalmo RA (2007) Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). 535
20. days after injection. *Fish Shellfish Immunol* 23: 867-876.
21. Van den Eede G, Aarts H, Buhk H-J, Corthier G, Flint HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, van der Vossen J, von Wright A, Wackernagel W and Wilcks A (2004) 'The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants'. *Food and Chemical Toxicol* 42: 1127-1156.
22. Vijay P, Steinek K, and meyer HHD (2008) Development of sensitive enzyme immunoassay Cry1Ab toxin in bovin cows (MON810). *Anal. Chim. Acta* 607: 106-113.
23. Ziemienowicz, A. 2001. Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiol. Plant.* 23: 363-374.

