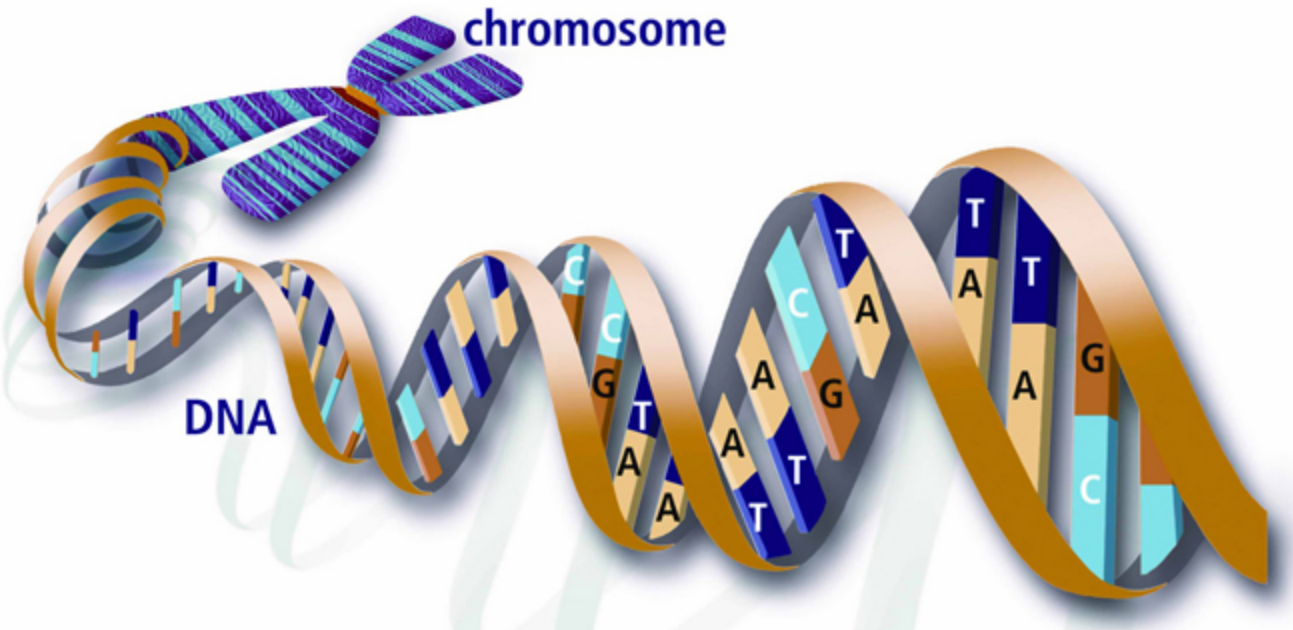
LABORATORY MANUAL FOR THE REGIONAL TRAINING COURSE ON "DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS AND BIOSAFETY FOR FOOD AND AGRICULTURE"

ICARDA, ALEPPO, SYRIA,

19–24 JUNE 2010



Editors

Ahmad Abdul Kader, Gretta Abou Sleymane, Fateh Khatib,
Joyce Sakr and Michael Baum

Jointly organized by

General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR)
International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)
Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)

TCP/RAB/3202

'Strengthening capacities towards the establishment of a regional platform for the detection of genetically modified organisms'

Laboratory Manual for the Training Course on

" Detection of Genetically Modified Organisms and Biosafety for Food and Agriculture"

ICARDA, Aleppo, Syria, 19-24 June 2010

Editors

Ahmad Abdul Kader- Gretta Abou Sleymane- Fateh Khatib

Joyce Sakr - Micahel Baum

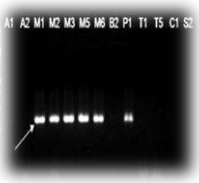
Jointly organized by

General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR)

International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)

TCP/RAB/3202



©2011 Food and Agriculture Organization of the United Nations **(FAO)**
International Center for Agricultural Research in the Dry Areas **(ICARDA)**
General Commission for Scientific Agricultural Research **(GCSAR)**
All rights reserved

Recommended Citation: Abdul Kader A.M.; Abou Sleymane, G.; Khatib, F.; Sakr, J. and Baum, M. (2011). Laboratory Manual for the Training Course on Detection of Genetically Modified Organisms and Biosafety for Food and Agriculture. 19–24 June 2010, ICARDA, Aleppo, Syria, ix + 151 pp.

AGROVOC descriptors: **GMO detection, Biosafety, Biotechnology.**

Printed by **FAO, Damascus Office, Syria**

Editors

Ahmad M. Abdul Kader
General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Biotechnology Department, Douma, P.O. Box 113, Damascus, Syria
e-mail: ahmad59@gmx.de

Gretta Abou Sleymane
American University of Science and Technology, Faculty of Health Sciences, GMO Testing Laboratory, Beirut, Lebanon
e-mail: gretta.abousleymane@gmail.com

Fateh Khatib
Aleppo Univ., Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Aleppo, Syria
e-mail: f.khatib@cgiar.org

Joyce Sakr
American University of Science and Technology, Faculty of Health Sciences, GMO Testing Laboratory, Beirut, Lebanon
E-Mail: joyce.s@live.com

Michael Baum
International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), P.O. Box 5466, Aleppo, Syria. Website: www.icarda.org
e-mail: m.baum@cgiar.org

Disclaimer

The content of this document is entirely the responsibility of the editors, and does not necessarily represent the views of the FAO, or its members. The designations employed and the presentation of material do not imply the expression of any opinion what so ever on the part of FAO concerning legal or development status of any country, territory, city or area or its authorities or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. The mention of specific companies or products of manufacturers, whether or not these have been patented, does not imply that these have been endorsed by FAO in preference to others of similar nature that are not mentioned. Editors in no way promote the exclusive use of any particular company or brand.

Acknowledgements

This laboratory manual is an output of the FAO regional project TCP/RAB/3202(D) entitled: **'Strengthening capacities towards the establishment of a regional platform for the detection of genetically modified organisms'**, and developed for a regional training on "**Detection of Genetically Modified Organisms and Biosafety for Food and Agriculture**" that was organised at ICARDA, Aleppo, Syria, from 19 to 24 June 2010. The editors wish to take this opportunity to sincerely thank everyone who supported the training and preparation of this manual . Our sincere thanks to **Dr. Kakoli Ghosh**, Lead Technical Officer of the Project and Team Leader of Seeds and Plant Genetic Resources Plant Production and Protection Division (AGP), FAO, for her dedicated support in realizing this manual and successful project implementation. Thanks are also extended to ICARDA staff for their cooperation in co-organizing the training course. We thank the European Commission Joint Research Centre (EU-JRC), Institute for Health and Consumer Protection Biotechnology and GMOs Unit (IHCP), ISPRA, Italy for contribution in training and technical support. We want to thank the National Project Coordinators Mona Siblini Halwany (Lebanon), Ibrahim Rawashde (Jordan), Abdelbagi M. Ali (Sudan), Hussein Alzubi (Syria), Rashed Borshaid (UAE), Hamoud Mokbel (Yemen) and in particular all the participants of the training course. Our sincere acknowledgments to Prof. Magdy Madkour, project international consultant for his continuous efforts, and valuable guidance. Finally special thanks are extended to FAO staff in Cairo and Damascus, for their continuous support in arranging and making all activities of the project possible and feasible. We are deeply grateful to all the contributors who worked hard and helped in all possible ways to ensure to have this manual available in Arabic and English for all.

Regional Training Course on:
Detection of Genetically Modified Organisms and Biosafety for Food and Agriculture

Laboratory Manual

Table of Contents

Title			Page
Acknowledgements			iii
Table of Contents			iv
List of Abbreviations			vii
Foreword			viii
PART 1. **Theoretical Background on GMO Detection and Biosafety**			0
1.1	**Introduction**		1
1.2	**Introduction to genetic engineering of crops**		3
	1.2.1.	Terminology	3
	1.2.2.	Genetic Engineering of Plants	3
	1.2.2. 1.	What do you need for transformation of an organism?	3
	1.2.2. 2.	General approach of plant transformation	7
	1.2.2. 3.	Types of plant transformation	8
	1.2.2.3.1.	*Agrobacterium t.*-mediated transformation	9
	1.2.2. 3.2.	Transformation using gene gun (biolistic)	17
1.3	**Detection and identification methodologies of GMOs**		26
	1.3.1.	The conversion of genetic information from DNA to phenotypes	26
	1.3.2.	What are GMOs?	28
	1.3.3.	DNA, protein, and phenotypes as targets for detection assays	29

	1.3.4.	Detection methods of GMOs		32
		1.3.4.1.	**DNA-based methods**	33
			1.3.4.1.1. General testing scheme	33
			1.3.4.1.2. Sampling procedure	34
			1.3.4.1.3. Extraction and purification of DNA	35
			1.3.4.1.4 Nucleic acid amplification methods using PCR	36
			1.3.4.1.4.1 Conventional Uniplex PCR	36
			1.3.4.1.4.2 Multiplex PCR	38
			1.3.4.1.4.3 PCR using mRNA templates	39
			1.3.4.1.4.4 Nested PCR	39
			1.3.4.1.4.5 Semi-quantitative end point PCR	39
			1.3.4.1.4.6 Semi-quantitative competitive PCR	40
			1.3.4.1.4.7 Real-time PCR	41
			1.3.4.1.5 Alternative and promising DNA detection techniques	44
			1.3.4.1.5.1. Southern blot	44
			1.3.4.1.5.2. DNA sequencing	44
			1.3.4.1.5.3. DNA microarrays	45
			1.3.4.1.5.4. Thermal cycling procedures	47
			1.3.4.1.5.5. Isothermic amplification	47
			1.3.4.1.5.6. Nanoparticle and microfluidic techniques	48
			.3.4.1.5.7. Mass spectrometry of DNA	49
			1.3.4.1.5.8. Supplementary photon-driven monitoring methods	50
			1.3.4.1.5.9 Biological approaches	51
		1.3.4.2	**Protein-based methods**	53
			1.3.4.2.1. ELISA	53
			1.3.4.2.2. Lateral flow sticks	54
			1.3.4.2.3. Western blotting	55
			1.3.4.2.4. Chromogenic/ histochemical assays	55
		1. 3.4.3	**Herbicide bioassays**	56

PART 2. Laboratory Manual for the Practical Work on GMO Detection and Biosafety					58
2.1	**Biosafety guidelines for laboratories**				59
2.2	**Biolistic transformation system of wheat**				64
2.3	***Agrobacterium* transformation system of chickpea**				75
2.4	**DNA based methods for GMO detection**				81
	2.4.1	DNA extraction (CTAB protocol)			82
	2.4.2	Spectrophotometric Analysis			85
	2.4.3	Agarose Gel Electrophoresis			86
	2.4.4	Screening of transgenic maize and soybean by Conventional PCR			88
		2.4.4.1.	General PCR conditions		88
		2.4.4.2.	Analysis of PCR products		89
		2.4.4.3.	Experimental		89
			2.4.4.3.1.	Introduction	89
			2.4.4.3.2.	Equipment	89
			2.4.4.3.3.	Reagents	89
			2.4.4.3.4.	Primers	91
			2.4.4.3.5.	Controls	92
			2.4.4.3.6.	Soybean specific PCR: Lectin gene	93
			2.4.4.3.7.	Maize specific PCR: Zein gene	96
			2.4.4.3.8.	Screening of 35S promoter and nos terminator	99
				2.4.4.3.8.1. 35S PCR	99
				2.4.4.3.8.2. nos PCR	102
	2.4.5.	Identification of MON810 maize and Roundup Ready® soybean by nested PCR			105
		2.4.5.1.	Detection of MON810 maize		105
		2.4.5.2.	Detection of Roundup Ready® soybean		110
	2.4.6.	Quantification of Roundup Ready® Soybean by Multiplex Real-time PCR			115
	2.4.7.	Quantification of maize TC1507 by Uniplex Real-Time PCR			121
References					128
Annexes					
Annex 1	Chemicals, equipment, and other materials used				142
Annex 2	Program				144
Annex 3	List of participants				147
Annex 4	List of instructors				150

List of Abbreviations

Name	Abbr.
Base pair	bp
Complementary DNA	cDNA
Deoxyribonucleic acid	DNA
Deoxyribonuclase	DNase
Deoxynucleosides triphosphate (dCTP,dATP,dGTP,dTTP)	dNTPs
DNA marker (ladder) (lambda DNA)	M
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
Food Agriculture Organization of the United Nations	FAO
General Commission for Scientific Agricultural Research	GCSAR
Genetically Modified Organisms	GMOs
Gibberelic acid	GA3
Indol -3-acetic acid	IAA
Indol-3- butyric acid	IBA
International Center for Agricultural Research in the Dray Areas	ICARDA
International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications	ISAAA
Murashige and Skoog / culture medium(1962)	MS
messenger RNA	mRNA
Naphthalene acetic acid	NAA
nopaline synthase	*nos*
Optical Density	OD
Polymerase Chain Reaction	PCR
2,4 -Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D
Ribonucleic acid	RNA
Ribosomal RNA	rRNA
Reverse Transcriptase-PCR	RT-PCR
Restriction Enzymes / Restriction Endonuclease	RE
Transfer DNA (i.e. that part of the Ti plasmid of Agrobacterium spp. Incorporated into the genome of infected cells,/ Not tDNA	T-DNA
transfer RNA	tRNA
Taq DNA Polymerase	Taq

FORWORD

Global food security will require significant gains in cereal productivity and production in both exporting and importing countries. Most countries in West Asia and North Africa cannot meet their demands for staple food (mainly wheat, but also rice) from domestic production and, therefore, depend on food imports to varying degrees, making them the most import-dependent countries in the developing world (FAO, 2008). Projections of the region's food balance indicate that dependence on imports will increase by almost 64 percent over the next twenty years (IFAD, Improving Food Security in the Arab World, January 2009). The expanding demand for cereals is expected to increase cereal net imports to 73.1 million tons by 2020 with wheat imports alone accounting for more than 50% of the total cereal net imports in 2020. Crop improvement programs need to become more efficient to close the yield gap between yields on station and farmer fields. Agricultural biotechnologies offer a number of techniques such as tissue culture applications, marker-assisted selection and genetic engineering can help to close the yield gap.

2010 is the fifteenth anniversary of the commercialization of biotech crops, first planted in 1996 (ISAAA Brief 42 for 2010 (James, 2010). The growth from 1.7 million hectares of biotech crops in 1996 to 148 million hectares in 2010 is an unprecedented 87-fold increase, making biotech crops the fastest adopted crop technology in the history of modern agriculture. Biotech crops already contribute to some of the major challenges facing global society, including: food security and self-sufficiency, sustainability, alleviation of poverty and hunger, help in mitigating some of the challenges associated with climate change and global warming; and the potential of biotech crops for the future is enormous (James. 2010).

The most important constraint to the adoption of biotech crops in most developing countries, that deserves highlighting, is the lack of appropriate cost/time-effective and responsible regulatory systems that incorporate all the knowledge and experience of 15 years of regulation (James, 2010). Current regulatory systems in most developing countries are usually unnecessarily cumbersome and in many cases it is impossible to implement the system to approve products which costs US$1 million or more to deregulate – this is beyond the means of most developing countries.

FAO has approved a two year regional project (TCP/RAB/3202) entitled "Strengthening capacities towards the establishment of a regional platform for the detection of genetically modified organisms". The participating countries include Lebanon, Jordon, Syria, UAE, Yemen and Sudan. The aim of the project is to strengthen regional capacities and to enhance regional information exchange and dialogue in biosafety that would lead to the establishment of a regional platform for handling and managing GMO detection and related procedures through increased regional cooperation and standardization of GM detection and analysis procedures within the region.

Given the strong trade relations among the countries of the region, the shared borders, the heavy imports of food products, and new investments that the area is attracting; such a network could also represent an economic opportunity. It could reduce dependency and costs associated to GM detection activities on one side, and generate additional resources through the charges from the services provided by the reference laboratories on the other side. In addition, as GMO detection activities are necessary for the release of permits, the project will favor more balanced public-private sector collaboration for better organization and management of imports within the national regulatory frameworks and standardized procedures. Through the project it is expected that the six countries (Lebanon, Jordon, Syria, UAE, Yemen and Sudan) will reinforce the ties between agriculture and environment at national and regional levels, increase training opportunities, share experience and know-how. It will also aim to increase North-South and South-South collaboration in this area.

As part of this TCP project, the General Commission for Scientific and Agricultural Research (GCSAR) in cooperation with the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA) and the Food and Agricultural Organisation of the United Nations (FAO) organized an advanced training course on: "Detection of GMOs & Biosafety in Agriculture and food. The training course was held at ICARDA, Aleppo, Syria, from 19 to 24 June 2010. Organizers selected and sponsored 18 technicians, agricultural engineers, research assistants, associates, assistant lecturers and researchers from the eligible countries participating in the project. The training consisted of both theoretical and practical sessions on methodologies of GMO detection, identification and quantification using traditional and Real Time PCR.

This Laboratory Manual on GMO detection has been prepared in English and Arabic language in the context of this training course. It presents a compilation of a general overview and technical protocols related to GMOs, all derived from specialized GMO references.
This manual can serve as the theoretical and practical guide on GMO detection for the Arab countries. The manual could be a reference in GMO detection to strengthening the regional capacities in GMOs detection and will support the Arab countries in the implementation of national Biosafety regulations under the Convention of Biological Diversity.

Editors

PART 1.

Theoretical Background on

'GMOs Detection and Biosafety'

1.1. Introduction

The deployment of agricultural technologies that enhance productivity without destroying the global natural resource base remains a critical generational challenge. Recent trends however indicate that, technologies, especially biotechnology, if properly harnessed, offer a responsible way to enhance agricultural crop productivity for now and the future.

The tools of biotechnology offer the ability to isolate, manipulate, and transfer genes between species expands the gene pool that is available and can be utilized in the genetic modification and improvement of plants, animals and microbes.

Although Genetically Modified Organisms (GMOs) are at times, subject to intense debates, it is accepted that genetic engineering technology has the potential to help increase production and productivity in agriculture, forestry, and fisheries: e.g. by raising the yield levels on marginal lands in developing countries, improving the quality of the raw material in the pro-vitamin A and iron-enriched rice, or improving various biotic or abiotic stress tolerances of new varieties of agricultural crops, At the same time one is also aware of the potential risks posed by genetic engineering, which fall in two main categories: the effects on human and animal health and the environmental consequences. The majority of these potential risks such as the effect on human health or on the environmentcan impact all countries and communities.

To ensure the safe use and development of gene technology and to prevent any potential harm to human health, animals, property, or the environment that may be caused by the use of GMOs, the risks of every new GM plant, animal, or microorganism are analyzed on a case-by-case basis.

At the technical level recent developments in the GM area which increased from 1.6 million ha in 1996 to reach 148 million ha in 2010 cultivated in 29 countries (James 2010), have illustrated the need to develop quick and accurate methods for the detection of GM plants and seeds in support of the GM inspections being carried out in many countries. A number of procedures can be employed to attempt identification of a genetically modified organism. Reliable GMO identification and quantification methods should be used to comply with the biosafey regulations.

For developing countries strengthening capacities in GMO detection can pave the way to strengthen the laboratories for GMO detection, release of permits, and facilitate information sharing for detection of GMOs at national level amongst laboratories. Eventually they can serve in future as nodes for the exchange of information, experience, and expertise and address specific capacity-building needs in GMO detection as required.

1.2. Introduction to genetic engineering of crops

1.2.1. Terminology:

A variety of terms are used in this area of research, so a small glossary is given below:

Genetic Engeneering: Modifying genotype, and hence phenotype by transgenesis (genetic transformation).

GMO: Abbreviation for genetically modified organism. An organism that has been transformed by the insertion of one or more transgenes.

Transformation: The uptake and integration of **DNA** in a cell, in which the introduced DNA is intended to change the **phenotype** of the reciepient organism in a predictable manner.

Transgenic organisms: an organism that has been successfully transformed and contains a new gene or genes which are stably inherited by its progeny. These are also known as transformants and GMOs.

Transgene: An isolated **gene sequence** used to transform an **organism**.

Vector: a small **DNA molecule**, (a plasmid or virus, bacteriophage, artificial or **cut DNA** molecule), that can be used to deliver DNA into a cell. 'Vector' can also describe agents (physical or biological) that transmit or carry diseases.

1.2.2. Genetic Engineering of Plants

1.2.2.1. What do you need for transformation of an organism?

1. **Host** - the organism that is going to take up the DNA and be transformed.
2. **DNA -** the DNA that is to be transferred into the host.

The host must be competent for transformation, that is, able to take up DNA. The bacteria used by Griffith were naturally competent to take up DNA. *Escherichia coli*, however, is not so obliging. For *E. coli*, a variety of treatments are used to make cells competent to take up DNA. One of these is treating the

bacteria with ice-cold calcium chloride ($CaCl_2$). It is not fully understood what this treatment does to the bacteria, but it is assumed that the physical barriers to DNA getting into the bacteria, the cell wall, and membrane are made more permeable and thereby allow DNA to enter the cell. The competent *E. coli* cells and the DNA are mixed together in a tube. After several minutes, the bacteria are briefly heated, then placed on agar medium and allowed to grow. Not all of the bacteria will be transformed. For *E. coli*, the highest transformation frequency obtained is about 1%. In other words, at best only one bacterium of every 100 will be transformed. In almost all transformation systems, the frequency of transformation, the fraction of cells that are transformed and take up DNA, is low. For *E. coli*, a typical transformation would use about 0.1 µg of DNA. On average only one molecule of every 10 000 successfully transforms the host. So, a major experimental problem is how to identify the relatively rare transformed cells among the mass of non-transformed bacteria.

How can the rare transformed bacteria be identified?

The transformants must be distinguishable from the others. The DNA that the bacteria take up should carry a gene that gives the transformed bacteria a distinct property or phenotype that can distinguish them from the non-transformed bacteria. In transformation of bacteria, the DNA used for transformation carries a gene for resistance to an antibiotic, e.g. ampicilline or tetracycline. Bacteria that have been transformed with the DNA will be able to grow in the presence of the antibiotic, while untransformed bacteria (the vast majority) will not.

After mixing the bacteria and DNA, the bacteria are placed on a medium that contains the antibiotic, on which only transformed bacteria will grow. This antibiotic resistance gene is also known as a selectable marker because it allows for direct selection of transformed bacteria. Selectable marker genes are essential for transformation of virtually all organisms, because the frequency of transformation is very low. Transformation with vectors that carry a selectable marker allows the transformed organisms to be simply identified.

So, transformation of bacteria can be summarized as:

- mixing together DNA (a vector) with cells that are able to take up the DNA
- treating the mixture to allow DNA to enter host cells
- growing the host cells
- identification of transformed cells

The DNA used to transform the bacteria needs to carry a selectable marker, such as a gene for resistance to an antibiotic, and an origin of replication. If the DNA introduced into the bacterium is not replicated each time, the bacterium divides, then the DNA transferred into the cell will not be present in all progeny and will rapidly be lost. So these two components are required in the DNA used for transformation. However, the purpose of transforming *E. coli* is not simply to introduce and copy these pieces of DNA, but to move other more interesting genes into the host organism. These essential components are assembled into vectors that can be used to carry other pieces of DNA into the bacterium. In the same way that vectors carry infectious diseases between organisms, transformation vectors carry DNA into the host.

Most transformation vectors are plasmids – circular DNA molecules that carry these essential components and can also have other DNA added to them.

How are other pieces of DNA added to a plasmid vector? The vector must contain a site where the circular DNA molecule can be cut with a restriction enzyme to open the molecule. Other DNA fragments can then be inserted into the vector using DNA ligase to join the DNA molecules and create a new circular plasmid DNA. These recombinant DNA molecules are formed in a test tube and then transferred into *E. coli* by transformation.

Note that plasmid vectors are normally quite small DNA molecules; many are only 3000 base pairs (bp) in size. There are a number of reasons for this:

- it is easier to transform *E. coli* with small DNA molecules;
- as the size of a DNA molecule increases, the likelihood of there being a single site for any restriction enzyme in the vector declines.

- If the vector is cut into two fragments, it is quite unlikely that it will be joined together in the right way by DNA ligation.

Vectors for transformation of *E. coli* are now quite advanced and have some added features that make cloning of DNA fragments more straightforward. For example, when you ligate together vector DNA and other pieces of DNA, you can create a number of different combinations. As a researcher, you are only interested in those that recombine the vector with other DNA. However, the vector can also simply ligate back to itself and produce a DNA molecule that will transform the bacteria and give antibiotic resistant colonies.

How can we distinguish between the bacteria that have been transformed with recombinant plasmids and just re-ligated vector plasmids that do not carry any new piece of DNA?

In many vectors, the vector contains a second gene (the 'blue gene'), and when this gene is expressed the bacteria are blue rather than the usual white when grown on a special indicator medium. The site for cloning fragments of DNA is in the middle of this blue gene. When a DNA fragment is inserted at this site, the blue gene is disrupted and inactivated. The bacteria that take up this recombinant DNA molecule will still be resistant to the antibiotic, but will now be white rather than blue. Thus, the blue colonies on the plate contain just the rejoined vector, while the white colonies contain recombinant DNA plasmids.

These plasmids have been manipulated so that one plasmid can serve many different functions. Many sites for restriction enzymes have been introduced into the vector so that DNA fragments with many different types of 'sticky ends', produced by different restriction enzymes, can be cloned in one vector. The vector can also be used to allow the DNA sequence of the cloned DNA fragment to be determined quite easily. RNA can be transcribed from the DNA that has been cloned into the vector, which can be useful in a number of research methods.

1.2.2. 2. General approach of plant transformation

All of the transformation methods for plants follow the general approach described below:

1. Tissue samples are removed from the host plant which is to be transformed. These samples are known as explants and are taken from a variety of tissues. Another source of plant material for transformation is tissue culture, where cells are growing under aseptic conditions. The following steps are all carried out under sterile tissue culture conditions, with the plant tissue growing on an artificial agar medium.
2. The explant is subjected to the transformation procedure. The goal is to transform as many cells as possible in the tissue. There are two important points to remember here: **first**, most transformation procedures are inefficient and only a small fraction of the target cells are actually transformed; and **second**, each cell that is transformed is unique. Even though all of the cells that are transformed may have received the same piece of DNA, the site at which the DNA integrates into the chromosome is different in each cell and this means that every transformed cell is genetically different.
3. Selection is applied to identify the rare cells that have been transformed. Only transformed cells will be able to grow under these selection conditions. Without this selection, many more plants would have to be regenerated and then screened later to find the rare transformed plant.
4. The composition of the growth medium, especially the levels of auxin and cytokinin hormones, is altered so that differentiated plants will regenerate from transformed cells.
5. Seed are collected from the regenerated, transformed plants and the progeny are examined for inheritance of the transgene (the gene that has been transferred).
6. The phenotype of the transgenic plants is then studied to determine if the gene(s) that have been introduced have altered the performance of the plant.

1.2.2.3. Types of plant transformation methods for producing transgenic crops

Most of the transformation methods used for higher eukaryotes relies on integration of the DNA that is transferred into a chromosome. When the DNA is integrated into the chromosome it will be reliably transferred through mitosis and meiosis, and stably inherited.

Some Transformation methods use purely physical methods to get DNA into an organism. The methods used for *E. coli* and yeast, using $CaCl_2$ or other chemical treatments to make cells competent, fall into this category. Other methods use a biological agent, such as a bacterium or virus, as the vector to transfer the DNA. Whichever method is used, the DNA must cross a number of physical barriers for transformation to be successful.

For transformation of a plant, these barriers include the cell wall, plasma membrane, contents of the cytoplasm, nuclear membrane, and ultimately lead to integration into a chromosome.

Transformation methods can be divided into two groups:

- *Agrobacterium*-mediated
  - *A. tumefaciens*
  - *A. rhizogenes*
- Uptake of naked DNA
  - Electroporation
  - Polyethylene glycol (PEG)-mediated
  - Particle gun

Below, we describe the two major methods used to **produce transgenic plants,** i.e. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and Transformation using gene gun (biolistic)

1.2.2.3.1. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

The first reliable method for plant transformation was based on a pathogen that attacks plants, especially grape and olive, and causes crown gall disease – formation of galls at the crown of a plant, the junction between root and shoot at the soil surface. The organism that causes this disease is *Agrobacterium* tumefaciens, loosely translated from the Latin as 'soil-bacterium tumor-maker'. The galls are produced at the site of infection and consist of a mass of undifferentiated cells, also known as tumors. *Agrobacterium tumefaciens* produces these tumors by transferring a piece of DNA from the bacterium to the plant. This is called the T-DNA for 'transferred DNA'. This natural transfer of DNA from a prokaryote into a eukaryote is unique in the world of biology.

The T-DNA carries a number of genes with promoters and other control sequences that are designed to function in plants rather than in bacteria. The genes on the T-DNA are then expressed in the plant. The T-DNA genes encode enzymes to make the plant hormones auxin and cytokinin.

What happens if you alter the concentration and balance between auxin and cytokinin?

Higher levels of auxin promote root growth, while cytokinin promotes shoot development. However, the T-DNA genes result in very high levels of both hormones, and this leads to the proliferation of undifferentiated cells – a tumor.

The T-DNA in the bacterium is part of a large plasmid known as the tumor-inducing or Ti plasmid. Bacteria which do not have the Ti plasmid cannot produce galls and are not pathogenic.

As another aside, what does the bacterium gain from causing this disease on a plant? Is the production of tumors on plants just an act of malicious snuggery on the part of the bacterium, or is there some good biological reason for why the bacterium causes these galls? The T-DNA also carries genes encoding enzymes for the production of opines, unusual amino acid derivatives. The tumor produces opines and so bacteria living in the tumor, outside the plant cells, use

these compounds as their source of carbon and nitrogen. Some of the other genes carried by the Ti plasmid encode enzymes to utilize these opines in metabolism. By producing opines the tumor provides an ecological niche for the *Agrobacterium* to grow. *Agrobacterium* has developed this unique method to transfer DNA from the bacterium into plants. This has now been manipulated to develop systems for transformation of plants.

The T-DNA region of the Ti plasmid, the portion that is transferred into plant cells, is physically defined by specific sequences of approximately 20 bp on either end of the T-DNA. Any DNA that lies between these border sequences will be transferred into the plant. The T-DNA normally contains genes for hormone synthesis and production of opines, but these genes are not required for the transfer of DNA from the bacterium. The bacterium is not aware of the sequence of DNA that is being transferred. This is important for two reasons: first, any piece of DNA can be placed between the border sequences and will be transferred from bacterium to plant; and second, the genes that result in altered synthesis of hormones, and thereby production of tumors, can be removed. Therefore, it is possible to obtain transformed cells which have normal levels of hormones and appear to be quite normal.

While plant cells can be readily transformed by *Agrobacterium*, there must be some method to distinguish between transformed cells and those that are not transformed. The fraction of cells that are transformed is small. Without any selection, most of the regenerated plants would not be transformed and some other method would have to be used to identify transformed cells and plants. In transformation of bacteria, plasmid vectors carry genes for resistance to antibiotics. This allows transformed bacteria to be identified based, for example, on their ability to grow in the presence of ampicilline. Similarly, the T-DNA that is transferred to plants must also carry a gene giving a selective advantage to transformed plant cells under specific conditions.

A selectable marker must be included in the T-DNA. For plants, the first selectable marker gene was for kanamycin resistance. The gene for resistance

was found in bacteria. This gene encodes a protein that adds a phosphate group to kanamycin, thereby inactivating the antibiotic. Growth of plant cells is also inhibited by kanamycin. If the bacterial protein that inactivated kanamycin could be expressed in plants, then plants should be able to grow in the presence of kanamycin. To express the protein encoded by this bacterial gene in plants, the gene first had to be modified. These modifications included removing the promoter and terminator sequences, which direct the transcription of this gene in bacteria, and replacing them with a promoter from a plant gene which directs a high level of expression of this gene in all plant cells and a transcription terminator which also works in plant cells.

This chimeric resistance gene is inserted into the T-DNA of the Ti plasmid so that it will be transferred from bacterium to plant. The Ti plasmid can be further manipulated so that:

1. The T-DNA genes that normally lead to production of tumors (i.e. the genes that direct synthesis of hormones) are removed.
2. A selectable marker gene for kanamycin resistance is added to the T-DNA between the border sequences.
3. Any other gene or genes can be included in the T-DNA and will be transferred from the bacterium into the plant.

With this modified Ti plasmid in *A. tumefaciens*, **how do we go about producing transgenic plants?**

The procedure is quite straightforward:

1. Remove tissue explants from the plant.
2. Incubate the wounded plant tissue with *Agrobacterium* carrying the modified Ti plasmid.
3. Place infected tissue on medium containing kanamycin.
4. Transformed cells divide and grow; these are transferred to medium to allow shoots to develop.

5. Shoots are placed on another medium to promote root development, so that small plantlets are produced.
6. Plants are transferred from agar medium to soil.

This method is very widely used for plant transformation, especially many of the model systems used to study plants – tobacco, petunia, and others. It used to be thought that *A. tumefaciens* was not very efficient at infecting monocots (including wheat, rice, and maize) and many legumes such as soybean. These are the crop plants for which there are the greatest economic incentives to develop transgenic varieties. Therefore, other methods were developed to transform these plants. All of these are based on physical methods to get DNA inside in a cell. However, in the last two years there have been a number of reports showing that *Agrobacterium* can be used to transform rice and maize at high efficiency.

*Agrobacterium c*arrying the modified Ti plasmid is then used to infect pieces of plant tissue. The T-DNA is excised from the Ti-plasmid, moved across the various barriers, and then inserted into the chromosome of the host. Many details of the molecular events involved in this process are now understood. The T-DNA has now transformed a small number of cells. Transformed cells grow in the presence of the selection agent (e.g. kanamycin) and fertile plants are then regenerated from these cells.

When bacteria or yeast are transformed with a plasmid, every cell that takes up the plasmid is identical. This is not true when plant cells are transformed with *Agrobacterium*. Each plant that is obtained from a separate transformation event should be regarded as unique with a distinct genotype.

One major difference is that the T-DNA must integrate into a chromosome, rather than replicate extra-chromosomally. The site of integration appears to be random. Because the T-DNA is integrated at different sites in different cells, each transformed cell is now unique. There are two reasons why this random integration is important:

- The T-DNA may insert into, and inactivate, a gene that is required for some other function or purpose. While this insertion may not be

immediately obvious, it may result in the inactivation of perhaps a gene for resistance to a particular pathogen.

- The site of integration can have a very large effect on the level at which the T-DNA genes are expressed. Expression can easily differ by a factor of 100 between individual transgenic plants, even though they contain exactly the same piece of DNA.

In addition to the variation produced by transformation, the process of tissue culture – growing plant material in culture, exposing it to hormones, antibiotics, and other exogenous agents, and regenerating differentiated plants – also produces variation. This is known as somaclonal variation. Starting with a single plant, this is cultured and produces callus – a mass of undifferentiated cells. From this, many plants are regenerated that should be genetically identical to the starting material. However, the plants show variation – unusual phenotypes or forms that are unlike the original starting plant. This phenomenon is well documented, but not well understood.

Since *Agrobacterium* transformation is not successful with some plant species, a variety of other methods have been developed. These all use physical methods to deliver DNA into plant cells.

The first method is virtually identical in principle to the methods used to transform microbes. Plant tissues can be reduced to a collection of individual cells that lack cell walls. This is done by treating plant tissue with a collection of enzymes that break down the cell wall polymers. These cells without any wall are called protoplasts. One of the major barriers to getting DNA into plant cells, the cell wall, has been removed in the preparation of protoplasts. Protoplasts can then be transformed in a number of ways. In electroporation, the protoplasts are mixed with the DNA – the genes to be introduced – and are then given an electric shock. In some way this high voltage makes temporary holes or pores in the plasma membrane which allows DNA to enter the cell. The DNA then somehow gets to the nucleus and is integrated into a chromosome. Electroporation is generally the most efficient treatment to get DNA inside plant protoplasts;

however, other chemical treatments, such as addition of PEG or $CaCl_2$, can also be used.

After transformation, plants must be regenerated from transformed cells.

The procedures used are quite similar to those used in *Agrobacterium*-mediated transformation:

- Selection of transformed cells, e.g. by their resistance to kanamycin.
- differentiation of shoots and roots (a process known as organogenesis)
- alternatively, some plant cells growing in culture can produce somatic embryos – embryos that are not derived from fertilized eggs. These embryos can develop into fertile healthy plants under the appropriate conditions.

The goal of these various methods is to produce fertile, transgenic plants from transformed cells.

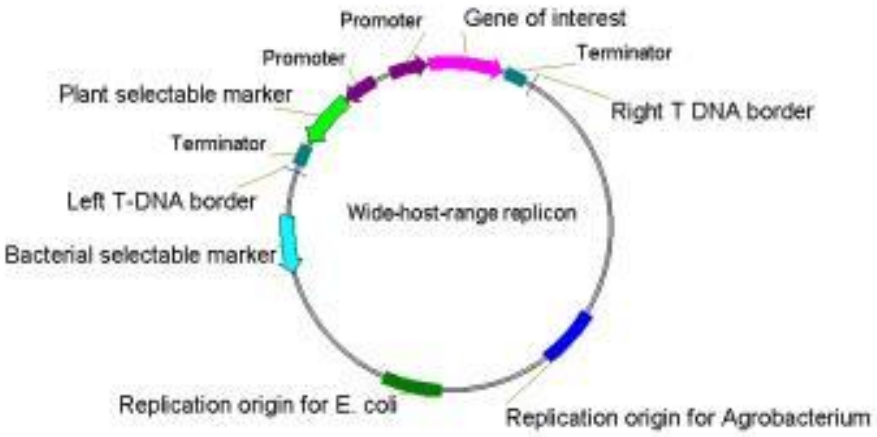
Another physical method to get DNA into protoplasts is by **microinjection**, using very fine needles and syringes to directly inject a solution of DNA into the nucleus of a cell. One at a time, individual protoplasts are held in place by suction from a pipette, while a needle is inserted through the cytoplasm into the nucleus. A few nanoliters (one millionth of a milliliter) of DNA solution are injected, since using a larger volume would make the cells burst. The needle is removed, hopefully the cell does not burst, and regeneration of plants is attempted from these injected, transformed cells. One advantage of this method is that the frequency of getting DNA into the protoplasts is very high – essentially all of the injected cells will get the DNA. However, the number of cells that can be transformed is limited. Other problems with this method include the level of technical sophistication required.

No matter which method is used to get the DNA into the plant cells, one central problem remains with all of these transformation methods that require the preparation of protoplasts: regeneration of plants from single cells. We have all

learned about the totipotency of plant cells in an early biology class; however, it is very difficult to achieve this with many plant species.

Steps for plant transformation with *Agrobacterium*

1. Clone the gene or gene fragment into the multiple cloning site of an intermediate vector.
2. Introduce the gene into an acceptor *A. tumefaciens* strain via triparental mating. (reciprocal recombination between the intermediate vector and the T-DNA region of the acceptor plasmid occurs during triparental mating or any other means (electroporation, heat shock..) and the gene is now part of the T-DNA region that will be transferred).
3. Co-cultivate the engineered *A. tumefaciens* strain containing the gene of interest with an explant from which regenerated plants can be obtained.
4. Culture the regenerating explant in the presence of a selectable agent and select cells, shoots and rooted-shoots that are resistant to the agent.
5. Screen the regenerated plant for the expression of the selectable and scorable markers screen the transgenic plant for the expression of the introduced gene.
6. Grow progeny of the transgenic plant and determine the inheritance of the introduced gene.



After: Phillip McClean (1998).

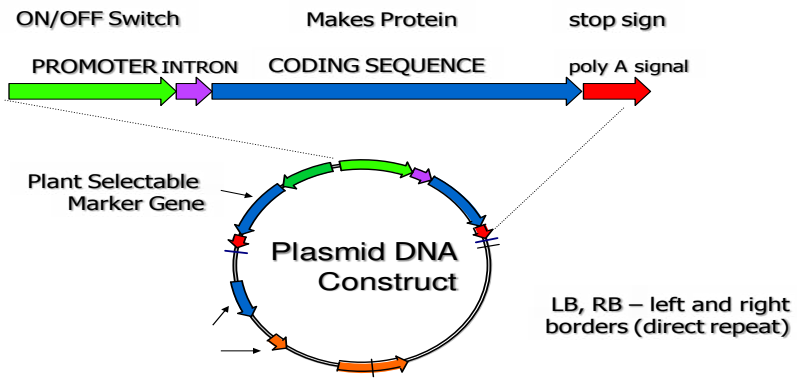


Figure above shows the plsmid DNA construct for transformation.

(Zhu 2000; Adrian *et al.* 2003; Barnum 1998; Chawla 2004; Nicholl 2002; Phillip 1998 a,b,c ; Zaid 2001)

How can plants be transformed without having to go through all of these tissue culture procedures, which are only successful with some species and also inadvertently introduce undesirable variation?

These concerns were one of the reasons behind development of **particle bombardmen**t for transformation of plants.

1.2.2. 3.2. Transformation using gene gun (biolistic)

1.2.2. 3.2.1. Background

The gene gun was created as a new way of proceeding with gene transformation of grains in response to the difficulty of getting bacteria across grain cell walls. It was designed by **John Sanford** at Cornell University in 1987 and made introducing new genetic material into plant cells much easier than previous methods, such as the use of viruses or *Agrobacterium*. The gene gun has a wide range of uses today and can be used on many organisms such as bacteria, yeasts, and mammalian cell lines – particularly those which have previously been difficult or impossible to transfect, such as non-dividing cells or primary cells. The transformation does not apply only to unicellular organisms but also whole objects such as leaves or entire animals, e.g. Drosophila and mice. It has also been particularly useful for chloroplasts because no bacteria or viruses were known to infect chloroplasts, and this method has allowed introduction of foreign DNA into chloroplasts.

There are three common methods of genetic engineering: the plasmid, the vector, and the biolistic (gene gun) methods.

The most well-known of the three is the plasmid method, which is generally used for altering microorganisms such as bacteria. The vector method is similar to the plasmid method, but its products are inserted directly into the genome via a viral vector. The biolistic method will be described in detail below. In this method the DNA is delivered into cells on microscopic particles of gold or tungsten.

1. DNA is mixed with microscopic (1–10-µm diameter) particles of tungsten or gold and the DNA is precipitated onto the particles; this results in particles coated with DNA.
2. The DNA-coated particles are placed on the end of a larger plastic bullet.
3. The bullet is loaded into a gun barrel and the target –plant tissue to be transformed– is positioned at the end of the barrel.

4. The gun is fired, accelerating the bullet to the end of the barrel. A plate with a small hole in the end stops the plastic bullet. However the small, DNA-coated particles pass through the hole and strike the target. The DNA-coated particles are analogous to the foolish car passenger who doesn't use a seat belt: when the car is brought to an abrupt halt by striking a large object, the passenger's momentum will cause them to continue moving, through the windscreen and onto the street.
5. Some of the particles will pass through the cell wall and enter individual cells. In electron microscope pictures of plant tissue that has been bombarded, the metal particles can be seen distributed in the tissue. Some of the DNA will be released from the particle, end up in the nucleus and integrate into a chromosome, resulting in transformation. Transgenic plants can then be produced from these transformed cells in a variety of ways.

The original method used an explosive charge (a blank cartridge) to accelerate the plastic bullet (the macroprojectile) loaded with DNA-coated microprojectiles. Because the gunpowder was found to damage the plant tissue at the end of the barrel, it has been replaced with a number of other methods. The most widely used is gas pressure, normally provided by compressed helium, but other methods have been used successfully.

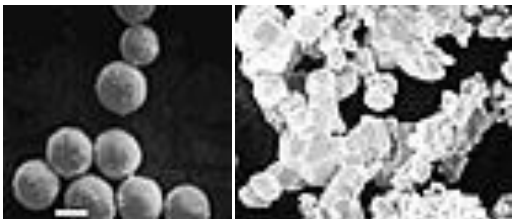
The primary advantage of particle bombardment is that it has an unlimited host range. Any cell can be physically penetrated by these particles, and thereby transformed. In fact, this method is not limited to plants and has been applied to animals.

1.2.2. 3.2.2. What 'target tissue' can be used? Living tissue of any species is suitable, so long as plants can be obtained or regenerated from it. Plant cells growing in culture, leaf tissue such as leaf disks, and immature embryos removed from developing seeds, have all been used. The ability to regenerate from single cells in culture is not limiting. For example, immature embryos which have been

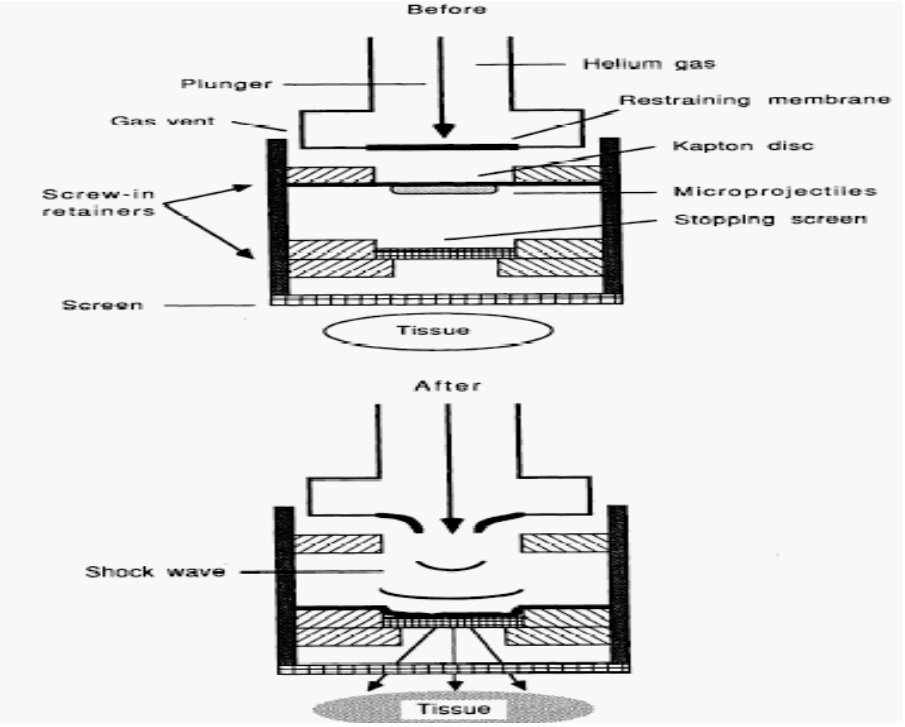
removed from a developing seed are in the process of developing into a seedling, and can continue on this path after they have been bombarded with these particles. Particle bombardment can be used to transform cells in organized morphogenic tissues, such as meristems or embryos. These have the advantage that they are already in the process of developing into differentiated tissues, and so are not dependent on tissue culture procedures to induce differentiation, organogenesis, or embryogenesis.

1.2.2. 3.2.3. How the gene gun works?

The gene gun is a form of the biolistic (also known as bioballistic) method. Under certain conditions, DNA (or RNA) become 'sticky,' adhering to biologically inert particles such as metal atoms (usually tungsten or gold). By accelerating this DNA-particle complex in a partial vacuum and placing the target tissue within the acceleration path, DNA is effectively introduced. Uncoated metal particles could also be shot through a solution containing DNA surrounding the cell thus picking up the genetic material and proceeding into the living cell. A perforated plate stops the shell projectile but allows the slivers of metal to pass through and into the living cells on the other side. The cells that take up the desired DNA, identified through the use of a marker gene (GUS is most commonly used in plants), are then cultured to replicate the gene and possibly cloned. The biolistic method is most useful for inserting genes into plant cells for pesticide or herbicide resistance. Different methods have been used to accelerate the particles: these include pneumatic devices; instruments utilizing a mechanical impulse or macroprojectile; centripetal, magnetic, or electrostatic forces; spray or vaccination guns; and apparatus based on acceleration by shock wave, such as electric discharge.

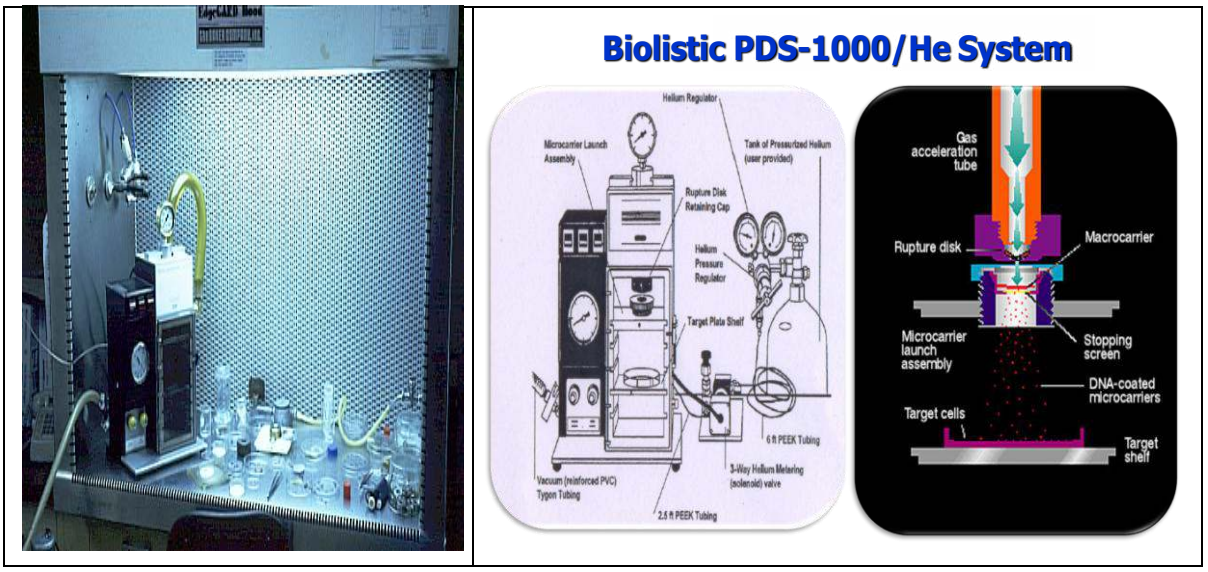


Above left: gold particles used in gene gun. Above right: tungsten particles used in the gene gun.



Above: Sketch of how a hand-held helium powered gene gun works, by pushing DNA-coated particles into tissue.

Below: A standard gene gun



There are several variables in these experiments that must be controlled in order to attain maximal transformation efficiency. Optimal responses have been shown to be dependent on the delivery of a sufficient number of DNA-coated particles, as well as how much DNA coats the metal particles. Temperature, amount of cells, and their ability to regenerate also has an effect on the overall efficiency, as well as the type of gun used, e.g. helium-powered vs. gun-powder, and hand-held vs. stand-alone. It is also important to adjust the length of the flight path of the particles: fragile tissues cannot be bombarded at the same high speed as those with more resistance to foreign particles entering. How to adjust these variables depends mainly on which metal particles are used to transfer the genetic material, and what type of cells are attempted to transfect.

Significance: Another important use of the DNA gun involves the transformation of organelles as mentioned above, e.g. chloroplasts, as well as yeast mitochondria. The ability to transform organelles is significant because it enables researchers to engineer organelle-encoded herbicide or pesticide resistances in crop plants and to study photosynthetic processes. DNA delivery with the gene gun also offers new advantages for research in such areas as DNA vaccination/genetic immunization, gene therapy, tumor biology/wound healing, and plant virology.

The major limitations are the shallow penetration of particles, associated cell damage, the inability to deliver the DNA systemically, the tissue to incorporate the DNA must be able to regenerate, and the equipment itself is very expensive. An objection to this method is that the DNA could be inserted into a working gene in the plant and many of the public worry that this new DNA could then be transferred to wild plants and resistance could be conferred to weeds or insects.

1.2.2. 3.2.4 Analysis of particle bombardment parameters to optimize DNA delivery into wheat tissues

In order to increase the efficiency of DNA delivery by particle bombardment to wheat (*Triticum aestivum* and *T. durum*) scutellum and inflorescence tissue and reduce damage to target tissues, the major parameters were assessed by scoring transient GUS expression in bombarded tissues. Of the parameters analyzed, the amount of plasmid DNA, spermidine concentration, presence of Ca^{2}+ ions, $CaCl_2$ concentration, amount of gold particles, gold particle size, acceleration pressure, chamber vacuum pressure, bombardment distance, osmotic conditioning of tissues, and type of auxin had a clear influence on transient gene expression (Rasco-Gaunt *et al.* 1999).

1.2.2. 3.2.4.1. Amount of plasmid DNA

There were no significant changes in levels of GUS expression resulting from precipitating 2.5, 5, 10 or 20 µg of DNA onto 2-mg gold particles. However, there was a significant reduction in expression at 0.5 µg DNA.

1.2.2. 3.2.4.2. DNA/gold precipitation parameters

The precipitation of DNA onto gold particles is the first step in the particle bombardment process, and its success will determine the potential amount of DNA for delivery. We evaluated the effect of changing the levels or concentration of each component of the precipitation mixture and explored different precipitation conditions. GUS expression data were substantiated by DNA recovery experiments, which allowed the quantification of precipitated and unprecipitated DNA.

1.2.2. 3.2.4.3. $CaCl_2$ and spermidine concentration

CaCl2 was found to be an absolute requirement for DNA precipitation, and in its absence most DNA was lost in the washes. A broad range of $CaCl_2$ concentrations (0.2–1.5 M) was found to give similar GUS expression, with the lowest level appearing optimal. A reduction in expression at 2.0 M $CaCl_2$ suggests the negative effect of a high salt concentration.

An absence of spermidine in the DNA/gold preparation resulted in inefficient precipitation and subsequent loss of DNA through the washes; 8–16 mM spermidine gave optimum transient expression. A high spermidine concentration (80 mM) resulted in a drop in GUS expression.

1.2.2. 3.2.4.4. Glycerol and PEG

The addition of 0.7% PEG (MW 1500) influenced neither GUS expression nor DNA precipitation. Glycerol and PEG have been used as precipitation agents in rice transformation, in which they were both reported to improve transient GUS expression. For wheat transformation, neither compound is beneficial to DNA precipitation and transient GUS expression.

1.2.2. 3.2.4.5. Amount of gold particles

The amount of gold particles required for optimal transient expression had a range of 29–235 µg per bombardment, but there was a significant drop in expression using a lower amount (15 µg). The drop in expression with lower amounts of gold was explained by results from the DNA resolution experiment in which it was seen that 0.25 mg of particles was insufficient to carry the precipitate of 5 µg of plasmid DNA. It is important to minimize the amount of gold particles used for bombardment to reduce damage to target tissues. Unbombarded tissues and tissues bombarded with lower amounts of gold and at lower pressures showed better shoot regeneration than those bombarded with high particle loads and at higher pressure. This effect was more marked in wheat varieties that respond poorly in tissue culture.

1.2.2. 3.2.4.6. Alternative sources and sizes of gold particles

Per unit weight, Bio-Rad 1.0-µm gold particles carried less DNA than Heraeus 0.4–1.2- µm or Bio-Rad 0.6-µm particles. This may be due to the smaller total surface area for DNA precipitation presented by the larger particles or to particle surface characteristics. A difference observed, however, was that bombarding with Bio-Rad 0.6-µm particles typically resulted in finer expression units than those obtained from Heraeus 0.4–1.2-µm or Bio-Rad 1.0-µm particles. This may

be related to the observation that the aggregation of 0.6-μm particles during precipitation was less pronounced than with larger particles. Moreover, the use of smaller particles would be expected to minimize tissue damage.

1.2.2. 3.2.4.7. Particle bombardment parameters

1) Acceleration pressure

There was no significant difference in GUS expression at pressures of 650–1100 psi; however, at higher pressures expression was significantly reduced.

Apart from the obvious effect on depth of penetration, particle acceleration also had an important influence on the distribution of particles. Low acceleration pressures (650–1100 psi) resulted in larger areas being covered by particles than higher acceleration pressures (1300 and 1550 psi).

Microscopic analysis showed that, at low pressures, expression events were evenly distributed and at a relatively lower density, thus reducing bombardment shock and tissue injury. At high pressures, a small area of the target tissues was very strongly targeted and thus likely to be damaged, while tissues at the periphery showed very few expression events.

2). Chamber vacuum pressure

DNA delivery with the PDS-1000/He gun was significantly more efficient at 28 inches Hg; lower vacuum pressures did not allow particles to reach the target tissue.

3). Bombardment (gap and target) distance

There are three adjustable distances that influence the delivery of particles using the PDS-1000/He gun: gap distance (between rupture disk and macrocarrier), macrocarrier travel distance (between macrocarrier and stopping screen), and the target distance (between stopping screen and target plate). The standard macrocarrier travel is 0.8 cm. We found that the combination of gap and target distances which gave the optimum transient expression for both types of tissues (scutellum and inflorescence) was 2.5 and 5.5 cm, respectively. Increasing either or both distances resulted in a significant decrease in transient GUS expression.

4). Multiple bombardments

There was no significant difference in GUS expression using single or multiple (two or three times) bombardments on wheat tissues. Multiple bombardments are useful mainly when primary delivery is not efficient; however, they increase the damage to target tissues and thus are undesirable for stable transformation.

1.2.2. 3.2.4.8. Tissue culture parameters

Osmotic conditioning of explant tissues. Culture of scutellar tissues on 6% (0.18 M) and 9% (0.27 M) sucrose significantly improved transient GUS expression in comparison with tissues cultured on 3% (0.09 M) sucrose. A similar response was observed from inflorescence tissues cultured in 9% (0.48 M) maltose compared with 3% (0.16 M).

Short-term high osmotic treatments (plasmolysis), typically for a few hours before or after bombardment, are thought to minimize cytoplasm leakage from target cells or tissues. Non-metabolizable osmotica such as mannitol, sorbitol, and PEG or combinations of these are commonly used at osmotic levels of 0.25–0.5 M. In our procedure, we exposed wheat scutellar and inflorescence tissues to high sugar levels for the whole callus induction period. The presence of these metabolizable osmotic agents (0.27 M sucrose and 0.48 M maltose) also improved long-term culture response and stable transformation.

Summary: A number of methods have been developed for transformation of plants. These utilize either biological or physical methods to deliver DNA into plant cells. Selectable marker genes (e.g. for resistance to kanamycin) have been constructed to allow identification of transformed cells. Regeneration of plants from transformed cells is not always straightforward. This aspect of plant biotechnology continues to improve, but some important crops can still difficult to be transformed.

(Adrian *et al.* 2003; Barnum 1998; Chawla 2004; Nicholl 2002; Phillip 1998 a,b,c ; Zaid 2001)

1.3. Detection, identification and quantitation methodologies of GMOs

1.3.1. The conversion of genetic information from DNA to phenotypes

All organisms, whether uni- or multi-cellular, have their genetic information stored within DNA, a specific sequence of four different nucleotides.

This information is then interpreted into functional traits as a result of two consecutive, fundamental, biological processes: transcription and translation (Alberts et al, 2002) (Fig. 1). In the first step "transcription", single stranded RNA is formed. With few exceptions, RNA is a one-to-one copy of one strand of the DNA. One exception is that the backbone of RNA contains ribose sugar instead of deoxyribose found in DNA. Another exception is that RNA contains uracil base instead of the DNA base, thymine. Basically, three different forms of RNA are synthesized which are transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), and messenger RNA (mRNA). All three types are needed for protein synthesis, which is the second fundamental biological step "translation". On one hand, mRNA is used as a template for protein synthesis; on another hand, tRNA and rRNA are helper molecules needed as constituents of the functional machinery of protein synthesis.

```
DNA:              5'..A CGG ATA GCA TGG AAT CGA CAG TTG CAG G..3'
                  3'..T GCC TAT CGT ACC TTA GCT GTC AAC GAC C..5'
  Transcription    ...                                        .....
mRNA              5'..A CGG AUA GCA UGG AAU CGA CAG UUG CAG G..3'
  Translation       ...  ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   .....
Protein       N-term. ...R   I   A   W   N   R   Q   L   Q...C-term.
```

Figure 1. The flux of genetic information from DNA to protein.

Proteins serve different functions, inside or outside the cell, as structural elements, regulators, transporters, and enzymes. The last two, especially, are involved in the synthesis of other structural macromolecules of the cell, the lipids and polysaccharides. As a result of the action of structural elements and of enzymes, the cytoplasm of a cell contains soluble, insoluble, high-molecular-weight, and low-molecular-weight substances, which reflects the interaction between environmental conditions (chemical and physical factors) and endogenous cellular factors (e.g. growth phase and stage of differentiation). Structural and functional elements contribute to the measurable properties of a cell, which are called phenotypes. A phenotype, therefore, is a direct reflection of a genotype (Knut and Heller, 2006) (Fig. 2).

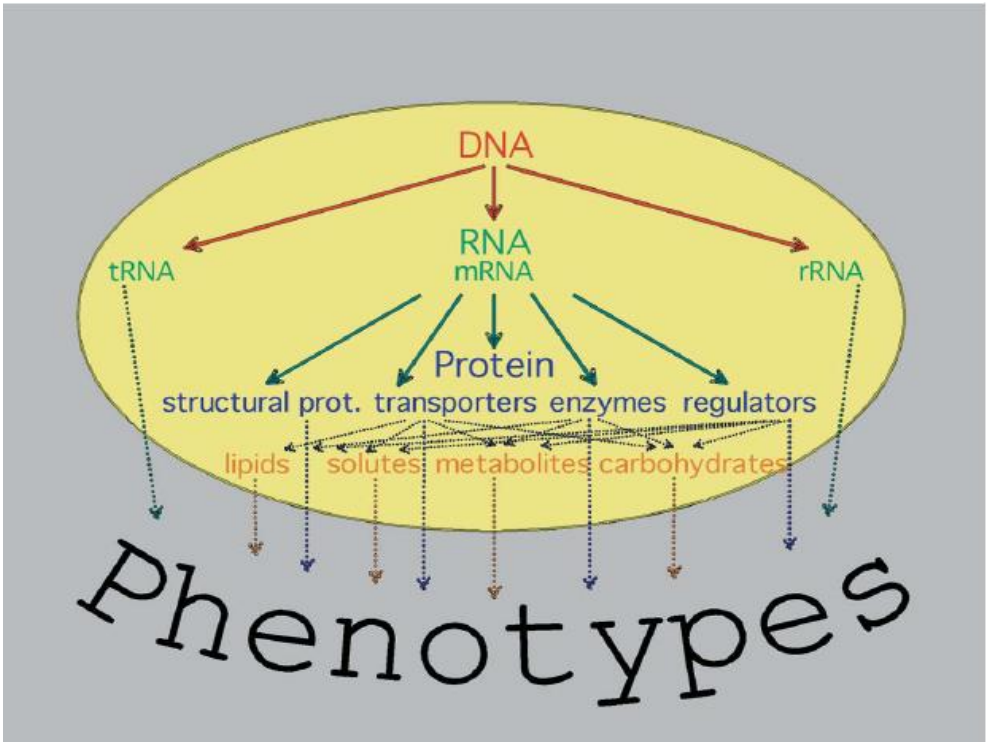


Figure 2. Transformation of the genetic information from DNA into phenotypes

1.3.2. What are GMOs?

A GMO is defined as an organism in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination. Generally, the genetic modification occurs through the following three techniques:

- Vector systems
- Direct introduction methods such as micro-injection, macro-injection, and micro-encapsulation
- Cell fusion (including protoplast fusion) or hybridization techniques

The genetic modifications are generally carried out by the insertion of several DNA elements from various sources into the genome of the host plant. A transgene construct typically consists of the following elements (Fig. 3):

- The promoter which functions as an on/off switch for when and where the inserted/modified gene is active in the recipient plant/organism
- The inserted/modified gene (structural gene) which encodes a specifically selected trait
- The terminator which functions as a stop signal for transcribing the inserted/altered gene
- Marker genes for distinguishing GMOs from non-GMOs during crop development may be present
- Residual DNA material from insertion plasmid vectors (Lubeck, 2001).

Figure 3. A simplified representation of a constructed transgene, containing necessary elements for successful integration and expression

1.3.3. DNA, protein, and phenotypes as targets for detection assays

With regard to GMOs – be they modified by natural mutation or by genetic engineering – information about the genotype of the organisms can be obtained on all levels of the process of conversion of genetic information into structural and functional traits: DNA, RNA, protein, cellular non-nucleic acid, non-protein substance, and phenotype levels. Conclusions about genetic modification that can be drawn from the detection on the different levels may vary substantially; this can be illustrated by three examples:

1. Cells of a bacterial strain, which are normally unable to degrade starch and to use the sugar moieties for growth because of lack of suitable enzymes, have the phenotype 'growth on starch as sole carbon source'. The conclusion is rather precise – the cells must have acquired at least one gene encoding a secreted starch-degrading enzyme. This proves that a new gene has been introduced into the cells. The gene, the mRNA, the degrading enzyme, and the degradation products of the starch may all serve as substances on which a detection assay may be established.
2. Soybean plants which are normally sensitive to a particular herbicide are resistant to the herbicide. Different explanations are possible. The plants have obtained a gene encoding a herbicide-degrading enzyme as a result of genetic engineering, or the plants have undergone spontaneous mutations which either prevent uptake of the herbicide into the plant or alter the target of the herbicide within the plant cells. To exclude the possibility of spontaneous mutations, different options for confirmation of genetic modification are possible. The gene encoding the enzyme, the mRNA transcribed from the gene, the protein expressed, or the herbicide-degradation products specific for the enzyme used may be detected by suitable assays.
3. Cells of a bacterial strain, which normally are able to grow on lactose as a sole carbon source, turn into a lactose-negative phenotype, i.e. they are no longer capable of utilizing lactose. Different explanations are possible. The bacteria have acquired – through genetic engineering or spontaneous

mutation – defects in genes encoding lactose-transport proteins or in genes encoding enzymes necessary for lactose or sugar metabolism. Because no specific degradation products, proteins, or mRNAs are present for analysis, the only way to exclude spontaneous mutation is to analyze the gene loci possibly affected by genetic modification. However, even determining the DNA sequence of the gene affected may be sometimes insufficient to distinguish between spontaneous mutation and genetic engineering.

When designing assays for the detection of modifications introduced by genetic engineering, the validity of the assays must be considered. In example 1, determination of the phenotype may be a convincing assay. In example 2, however, determination of the phenotype is of no value for a valid assay must be based on determination of specific degradation products, enzymes, mRNA, or DNA. In example 3, only assays based on the determination of specific DNA sequences will yield reliable results.

An additional point that must be considered when relying on the conversion of DNA into structural and functional traits is the degeneration of genetic information. The only biological process resulting in an exact 1:1 copy of the DNA is replication. Transcription usually yields 1:1 copies of the transcribed DNA regions (Fig. 1); however, non-transcribed DNA regions will never show up at the RNA level. Furthermore, especially in higher organisms, the primary transcript produced by the step of transcription may be altered by an editing process "splicing" in which specific sequences – called introns – are deleted from the primary RNA transcript to form the mature mRNA.

During translation, further information is lost or obscured. Firstly, as within the process of transcription, only part of the mRNA is translated into protein. The regions translated are called open reading frames. Secondly, a frame of three mRNA nucleotides (codon) is required to encode one amino acid (Fig. 1). Three nucleotides out of four offer the possibility of forming 64 different combinations. However, only 20 amino acids are used for protein synthesis. In fact, several codons code for the same amino acid – the amino acids serine, leucine, and

arginine are each encoded by six different codons. Only methionine and tryptophan are encoded by one codon each. The amino acid sequence of a protein is, therefore, only partly suitable for deducing the nucleotide sequence of the mRNA. Finally, many proteins are subject to post-translational processing. One result of this processing may be removal of part of the polypeptide chain. It is obvious that no information about the mRNA or DNA sequence of the removed parts can be deduced from the mature protein.

While sequence analyses of RNA and protein enable some conclusions about the DNA sequence; analyses of other constituents of the cell (lipids, carbohydrates, metabolites, solutes, and phenotypes; Fig. 2) do not provide any clues about the DNA sequence. Although, as shown above, such analyses may indicate the presence of a genetic modification, no information is obtained about the true nature of the modification. Thus, the ideal target molecule for detecting genetically engineered modifications is the DNA, in addition to the fact that the most sensitive, rapid, and powerful analytical methods available are for DNA.

Introduction of a foreign gene into the genome of an organism can, furthermore, be detected unambiguously only at the DNA level. For example, the presence of a bacterial enzyme in a plant extract may be a result of contamination. As long as the enzyme has not been altered by post-translational processes specific for plants, the protein itself will not reveal whether it has been expressed in a plant or in a bacterium. The corresponding gene, cloned in a vector construct, transformed into the plant, and integrated into the plant DNA, can always be identified as a foreign gene, because it is flanked by DNA sequences which do not naturally flank this gene. Therefore, an assay targeting the junction region between two DNA sequences of different origin unambiguously identifies a product of a genetic modification process; the unique DNA sequences are exclusively present in the specific recombinant DNA construct.

1.3.4. Detection methods of GMOs

GMOs can be identified by detecting either:

- the inserted genetic material at the DNA level
- the mRNA transcribed from the newly introduced gene
- the expressed protein or metabolite
- the new phenotypic trait

DNA-based methods are primarily based on amplifying a specific DNA sequence with the polymerase chain reaction (PCR) technique.

RNA-based methods rely on the reverse transcription of RNA into complementary DNA (cDNA) or on specific binding between the RNA molecule and a synthetic labeled RNA or DNA probe.

Protein-based methods rely on a specific binding between the target protein and an antibody. The antibody recognizes the foreign molecule, binds to it, and the bound complex is successively detected in a chromogenic (color) reaction. This technique is called ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays).

Phenotype-based methods rely on the detection of the resulting phenotype such as herbicide tolerance.

Irrespectively of the testing method, the analysis of GMO or GMO-derivatives in foodstuffs is a **stepwise process**; it includes the following stages:

1. Sampling of the material to be analyzed
2. Homogenization of the sample
3. Isolation/purification of DNA/RNA/protein
4. Analysis to determine whether the GM molecule is present
5. Identification of the molecule that is detected
6. Quantification to determine how much GM material the sample contains
7. Interpretation of the analysis results, expressing any associated uncertainties, e.g. statistical inaccuracies and limitations of the method

(Holst-Jensen, 2001; Lubeck, 2001; Bonfini *et al,* 2002 ; VanDuijn *et al*, 2002 and Arvantoyannis, 2003).

1.3.4.1. DNA-based methods

In DNA-based methods the detection and quantification of GMOs – in raw materials, ingredients, and final products – is based on the detection of the transgene that has been inserted into the plant.

1.3.4.1.1. General testing scheme

DNA-based screening, detection, and quantification of GMOs in food and feed samples follows sampling, nucleic acid extraction, amplification, detection, quantification, and scientific evaluation of results (Fig. 4). Clearly, each of these steps has its own limitations; however, highly complex starting materials, in particular, may require treatment on an individual basis. The final conclusion is directly dependent on proper selection of valid methods in accordance with internationally harmonized protocols (Kuiper, 1999; Anklam et al., 2002 and Holst-Jensen and Berdal, 2004).

Each of the indicated steps must be evaluated in detail and finally demonstrated by conducting labor-intensive international trials. Mandatory laboratory methods are released on the basis that, in principle, they provide reliable means of detecting genetic modifications of food or feed.

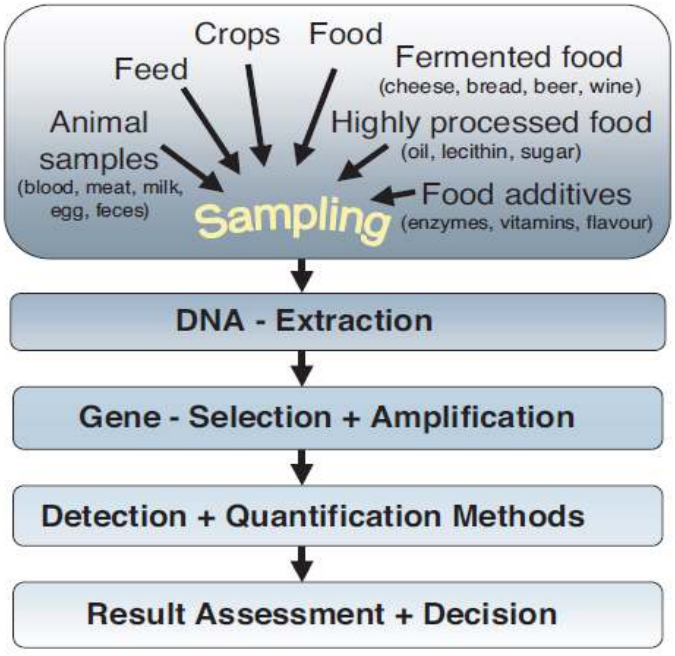


Figure 4. General GMO analysis scheme providing the major steps from sample collection until the final assessment.

1.3.4.1.2. Sampling procedure

The most essential prerequisite for subsequent DNA analysis is a representative sampling that will guarantee a statistically valid conclusion. Due to the great heterogeneity of highly diverse food material, it has been necessary to develop special sampling plans (Gilbert, 1999). As a logical consequence, the outcome of subsequent analytical methods is only as good as the quality of sampling. Generally, there are two possible approaches that are often discussed; either formation of a large sample with further sub-sampling or production of multiple samples.

In addition, the particle size and distribution of the raw material as well as the time at which samples are taken within the production process must be taken into consideration. Furthermore, there are different sampling methods for different types of samples, such as European Commission Recommendation (EC) N° 787/2004 for bulk agricultural commodities and non packed food products and ISO 24333:2009 for cereals and cereal products.

Careful attention to prevent contamination has led to taking essential physical precautions when handling any transgenic material. During sampling to laboratory analysis, any aerosols, polluted equipment, and consumables must be excluded. From a practical standpoint, authentic reference materials are available for selected transgenes, although international standards and DNA procedures must be developed and provided for each GMO and for food and processed food individually.

1.3.4.1.3. Extraction and purification of DNA

By taking advantage of the ubiquity of DNA genetic material in every organism, all transgenic DNA will be identified if DNA extraction is successful and some information about the target sequence is available. The suitability of different methods for sample extraction and DNA purification for material from different sources must therefore be considered. Isolation and purification of probable GM DNA from samples of different origin are the initial key steps in the whole procedure. Hence, individual extraction procedures that lead to a wide variety of purification procedures form a vital part of the process.

Typically, samples are mechanically disrupted and/or treated enzymatically with the help of organic compounds, detergents, enzymes, and chaotropic salts to release DNA in solution. Subsequent alcohol precipitation of the DNA results in its isolation. The common extraction method based on precipitation of DNA with a buffer containing CTAB (cetyl-trimethylammonium bromide, which creates a complex with nucleic acids that can be isolated after treatment with organic solvents) is useful for a wide range of applications (Querci *et al*, 2006). In addition, high-throughput procedures can make use of ion exchange or silica chromatography, and paramagnetic particles which selectively bind nucleic acids under a narrow range of salt, pH, and organic solvent conditions; thereby enabling capture, washing, and elution of DNA within the same cartridge. These extraction methods, which may be adapted to routine robotic applications, result in a highly standardized DNA purification process (with less cross-contamination and reduced individual sample variability yet similar DNA purity and homogeneity). The method should, however, be selected to favor comparatively high-quality DNA despite occasionally lower yield. Indeed, a number of situations in which extraction of DNA has been limited (e.g. problematic matrices, for example soybean oil) have now been successfully overcome by use of individually established procedures for difficult samples (Pauli *et al.*, 1998 and Gryson *et al.,* 2002).

1.3.4.1.4 Nucleic acid amplification methods using PCR

A frequent disadvantage of food inspection is the limited availability of target molecules in the sample material to be analyzed. When the requisite prior extraction procedures have been conducted, DNA material of low abundance can be enriched by introducing selective amplification reactions that take advantage of naturally occurring nucleic acid polymerization. The objective of this method is augmentation of trace amounts of distinct nucleic acids, enabling further identification and quantification.

1.3.4.1.4.1 Conventional Uniplex PCR

PCR was developed in 1985 by Kary B. Mullis. It is the most widespread method for detection and identification of GMOs; in fact, PCR is a relatively simple but very effective means of detecting minute quantities of DNA sequences by exponential amplification. It is a multiple step process with consecutive cycles; each cycle consists of three different steps represented by three different temperatures. In the first step "denaturation", the DNA template is denatured by heat exposure to serve as a template for the DNA polymerase. In the second step "annealing", the temperature is cooled down to allow the annealing of the primers, and in the third step "extension", primers are extended by the DNA polymerase to form a copy of the target DNA. The cycle is then repeated many times (Fig. 5). The primers define the limit of the region to be amplified; as they should flank the target sequence, some sequence information is required if selective amplification is to be achieved. The recognition of the primers hybridized on a single-stranded template DNA by the DNA polymerase leads to subsequent DNA polymerization and selective amplification of previously known DNA fragments (Fig. 5). The DNA polymerase is heat stable; it is purified from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus,* which inhabits hot springs; therefore, it is the unique properties of the *taq* DNA polymerase that allow PCR to be automated, as there is no need to add fresh polymerase after each denaturation step. DNA polymerase replicates the DNA between the

primers using all four of the deoxyribonucleoside triphosphates (dGTP, dATP, dCTP, and dTTP) provided in the reaction.

PCR is conducted in a thermocycler, an instrument which can be programmed to rapidly alternate from one setting of temperature to another. Many reviews detailing technical hints for PCR have been published (Innis et al., 1990 and Rapley, 1998).

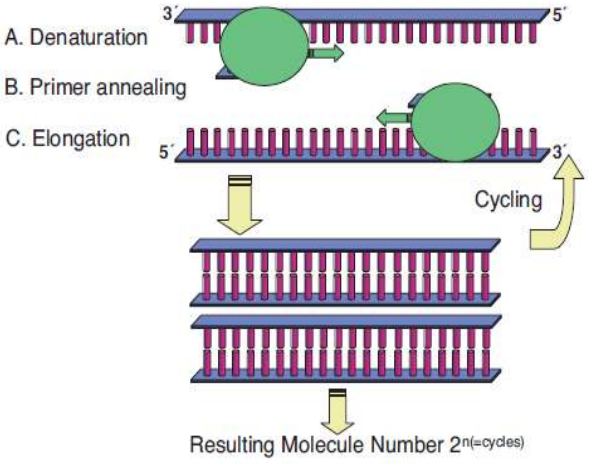


Figure 5. General principle of PCR. The cycle comprises three steps: (A) denaturation of double-stranded target DNA by heat separation of base-pair hydrogen bonds; (B) the forward and reverse primers anneal to their complementary single-stranded target; (C) subsequent 5′–3′ elongation of each primer by means of a heat-stable DNA polymerase (Taq polymerase = green circle) generating a new double-stranded DNA. Each subsequent cycle will, in theory, double the initial amount of DNA fragments and therefore enable exponential increase of initial DNA molecules.

Performing several (up to 40) cycles in succession leads to exponential accumulation of the desired DNA fragment (transgene) up to a detectable amount. After amplification, the yield and the specificity of PCR are verified by means of common methods:

- Gel electrophoresis
- Restriction enzyme digestion
- Southern blotting
- DNA sequencing

In GMO testing, PCR can be designed to detect any fragment of the inserted construct: promoter, structural gene, terminator, or marker gene (Holst-Jensen, 2003). For instance, PCR can be used for a general screening of GMOs targeting transgenic elements which most GMOs contain, such as the commonly used Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter or *A. tumefaciens* nos promoter. Alternatively, other targets may be detected in a qualitative PCR. In fact, there are three different strategies for choosing an appropriate target (Abdul Kader *et al.,* 1999; Lubeck, 2003; Weijdeven, 2003; Holst-Jensen, 2001 and Querci *et al*, 2006):

- To detect genetic elements commonly found in GMOs such as the 35S promoter or nos promoter. This is called a general screening of GMOs and allows the detection of the presence or absence of GMOs.
- To detect a particular gene construct by detecting the junction region between two DNA segments. This allows the specific detection of the genetic construct.
- To detect a particular event by detecting the junction region between the construct and the plant genome. This is used to identify the specific transformation event.

1.3.4.1.4.2 Multiplex PCR

Multiplex PCR is a PCR-based method in which several target DNA sequences can be simultaneously screened for and detected in a single reaction using multiple primer pairs. In principle, standard PCR methods may be combined in the same reaction; however, in practice multiplex PCR is a complex process. For instance, each method may require different reaction conditions, such as different annealing temperatures or different reagent concentrations. In addition, the combination of primer pairs from different methods may increase the risk of amplifying non specific DNA fragments. Finally, when more than one target

DNA is being amplified in a PCR reaction, the two targets will compete for reagents. Normally, a fragment present in a large number of starting copies will compete with another fragment that may be present only in very few numbers. In addition, if two amplicons are amplified with significantly different efficiency, this may also have a severe impact on the final ratio of the two amplicons.

Therefore, the development of multiplex assays requires careful testing and validation. Several papers have been published presenting multiplex assays applied for GMO (Matsuoka et al, 2001; Hemandez *et al*, 2005; Foti *et al*, 2006 and Randhawa *et al*., 2010).

1.3.4.1.4.3 Reverse Transcription PCR

This is a commonly used variant of PCR that targets the expressed mRNA instead of DNA. mRNA is first reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) by the enzyme reverse transcriptase that is an RNA-dependent DNA polymerase. The resulting cDNA is then amplified using regular PCR. Reverse transcription PCR (RT-PCR) technique is useful in gene expression studies.

1.3.4.1.4.4 Nested PCR

Nested PCR is a version of PCR which utilizes two sets of primers (external & internal) (Querci *et al*, 2006) . The external set generates a normal PCR product while the second set targets an amplicon that lie within the first PCR product generating a shorter amplicon. Consequently, nested PCR increases both the sensitivity and fidelity of the basic PCR protocol.

1.3.4.1.4.5 Semi-quantitative end point PCR

Conventional PCR monitors PCR products at a single point in the reaction profile, before the plateau phase. Quantification can thus be achieved from 'end-point' PCR.). Since the relationship between DNA concentration and the PCR signal is not linear at this stage and because this relationship is not constant from

one analytical run to another, the precision for quantification using conventional PCR is limited. Therefore, conventional PCR is only semi-quantitative, while other PCR-based methods are regarded as quantitative (Lubeck, 2001).

1.3.4.1.4.6 Semi-quantitative competitive PCR

Another approach for GMO quantification using conventional PCR is competitive PCR (Hupfer *et al*, 2000; Lubeck, 2001). In a qualitative conventional PCR, an amplified product is synthesized from one primer pair. However, in competitive conventional PCR, a second synthetic DNA fragment 'the competitor' with known concentration is added to the reaction mixture, it has the same binding sites for the same primer pair but is different in size. By running a series of PCR with different concentrations of the synthetic DNA, it is possible to determine the initial amount of target DNA. If the resulting PCR products are of equal intensity as detected by gel electrophoresis, then the initial amount of template DNA equals the initial amount of synthetic DNA. In a double-competitive PCR (DC-PCR) this principle is applied twice; once for a general housekeeping gene and its competitor and once for a GMO-specific gene and its competitor. The results from both PCR reactions allow for GMO quantification taking into consideration the amount of genomic DNA of the organism. Competitive and double-competitive PCR methods are semi-quantitative; they require a standard with known amount of synthetic DNA. Consequently, the results can only indicate a value below, equal to or above a defined standard concentration. The competitive as well as the double-competitive systems have the distinct advantage that if laboratories are already performing qualitative PCR methods then no additional equipment is needed.

1.3.4.1.4.7. Real-time PCR

Real-time PCR is a PCR technique that allows the quantitation of nucleic acids by indirect monitoring of the amplicons through measuring the fluorescence that is generated after each cycle (Giulietti *et al.,* 2001). There are two main real-time PCR approaches:

The first approach uses sequence-independent dyes that fluoresce when intercalated with any double-stranded DNA, e.g. SYBR green. A disadvantage of this method is its lack of discrimination between the target amplicon and non-specific double-stranded DNA. Therefore, the specificity of SYBR green real-time PCR is verified by melting-curve analyses that distinguish potential non-specific side products from the desired known amplicon based on their melting temperatures. The advantages of this approach are its easy application and relatively low cost.

The second approach utilizes hybridization probes such as TaqMan® probes which specifically hybridize to the target amplicon. TaqMan® probes are labeled with both a reporter dye and a quencher dye and due to their proximity, the fluorescence of the reporter dye is inhibited. During elongation, the reporter dye is liberated from the quencher by the exonuclease activity of the *Taq*-polymerase, thereby generating a fluorescence signal that is proportional in intensity to the number of templates present (Fig. 6). The main advantage of using fluorescence-labeled probes, in addition to the primers, is the enhanced PCR specificity.

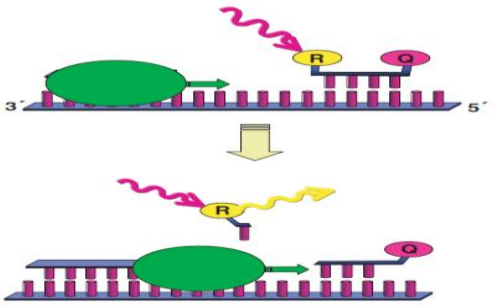


Figure 6. Principle of the 5′-nuclease assay (TaqMan®). An internal probe labeled with a reporter (R) at the 5′-end and a quencher (Q) at the 3′-end is split by the exonuclease-activity of the *Taq* polymerase (green circle) during the elongation phase of each PCR cycle, leading to increased fluorescence emission.

Both sequence-independent and hybridization probe techniques are carried out in a modified PCR thermocycler that is able to monitor the fluorescent signal at each cycle, and to determine the threshold cycle (Ct) at which the amplified product begins its exponential increase. The Ct value is inversely proportional to the log of the initial copy number of the target DNA. Experimentally, a set of standards is run in each analysis, giving rise to a standard curve. The results obtained for individual unknown samples are compared to the standard curve to determine the GMO content of those unknowns. In the tested sample, an endogeneous reference sequence is quantified in addition to the GM DNA. The modified DNA is then expressed as a percentage relative to the reference sequence (Vaitilingom *et al*., 1999; Siesler *et al*., 2000; Holst-Jensen, 2001; Lubeck, 2001; Bonfini *et al*., 2002 and Querci *et al*., 2006).

Since different GM events may contain different copy numbers of common sequence elements such as 35S promoter, nos terminator, or one of the inserted genes, GMO quantification based on these sequences would not be accurate. Therefore, the best way for GMO quantification is event-specific quantification which provides not only more precise results regarding the type of GMO present but also more accurate quantitative results (Lubeck, 2001; Terry and Harris, 2001; Taverniers *et al*., 2005 and Querci *et al*., 2006).

In summary, real-time PCR enables both qualitative and quantitative (absolute and relative) analysis in a short period of time with a high sensitivity and throughput, and minimizes unnecessary post-PCR manipulations. Only in conjunction with optimized sample collection and processing, contamination-free DNA extraction, and suitable real-time PCR methods, can valid data interpretation be provided on the basis of such extremely sensitive PCR assays (Klaften *et al*., 2004). Several reports concerning cross-platform reference materials and different recommendations for detecting GMOs by real-time PCR are available (Huebner *et al*., 2001; Terry *et al*., 2002 and Taverniers *et al*., 2004).

Important considerations

Sufficient bioinformatic support should be available in Real-Time PCR, to draw reliable results and a consistent conclusion concerning GMO analysis. For instance, the availability of sophisticated software, gene databases, statistical requirements and normalization procedures should be taken into consideration. In fact, it is important to search for the most suitable amplicon and probe combination; studies have shown that not all selection of amplicon and complementary probe produce good results. Several software packages are available which support primer and/or probe selection and homology searches in gene databases (HUSAR and EMBL-EBI). Success in both theoretical and practical specificity predictions enables highly reliable PCR-mediated GMO monitoring to be performed. All requirements when performing relative or absolute quantification using real-time-PCR must be elucidated (Wong and Medrano, 2005). It is also important to take into account the problems that may arise from shifting genome equivalents in different GMO tissues [e.g. paternal versus maternal events or multiple chloroplast versus single nuclear gene copy numbers], and from contaminating environmental DNA. It is essential to consider as well the absolute number of GMO-specific DNA molecules should exceed 20 copies in the isolate to enable good statistical probability (Kay and Van den Eede, 2001). An important objective is to achieve reliable analysis and interpretation of generated quantitative PCR data (Burns et al. 2004). As a consequence, standardization of GMO analysis using PCR has been extensively discussed, and several international trials have been reported (Roseboro, 2000) with acceptable limits of detection/limits of quantitation that serve the regulatory requirements of each authority (Einspanier, 2001a and Huebner *et al.*, 2001).

1.3.4.1.5 Alternative DNA detection techniques

In addition to the above-described PCR-based techniques, several alternative non- PCR methods which are based on DNA augmentation have been developed. New technological developments might lead towards a new set of nucleic acid labeling and/or detection methods exploiting electrochemical sensors, nanoparticles, microfluidic devices, microarrays or combinations of these innovative approaches (Carpini *et al*., 2004; Obeid *et al*., 2004; Jain, 2005; Kalogianni *et al.,* 2006 and Kim *et al.,* 2005). Although some of these DNA-detection techniques are currently limited with regard to GMO analysis, future developments will undoubtedly extend their viability. Clever combination with the PCR technique of the different methods described below should; however, be recognized as being of high potential, as shown for example in microarrays and nanotechnology.

1.3.4.1.5.1. Southern blot

In Southern blot, a specific labeled probe complementary to a small region of the DNA of interest is used to hybridize to this DNA.

This technique was developed by Edward Southern, in the mid of 1970s, to detect target DNA fragments. Generally, genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes and the resulting fragments are separated according to size by electrophoresis on an agarose gel. The DNA is denatured in situ and transferred from the gel to a membrane. The target DNA is then detected by using complementary probes which can be labeled with radioactive or non-radioactive methods (Barnum, 1998; Chawla, 2002; Grandillo and Fulton, 2002 and Knight *et al*., 2002). In GMO analysis, Southern blotting is more applicable in research rather than in routine GMO testing.

1.3.4.1.5.2. DNA sequencing

DNA sequencing is a central technique by which the precise order of nucleotides in a segment of DNA can be determined. Rapid and efficient DNA sequencing methods became available in the late 1970s and revolutionized the work on genes

structure. Two different techniques were developed simultaneously by Maxam and Gilbert at Harvard (Maxam and Gilbert, 1977), and by Sanger and coworkers at Cambridge (Sanger *et al*., 1977). DNA sequencing, as Southern blotting, is a technique that is mainly applied in GMO research.

1.3.4.1.5.3. DNA microarrays

The need for rapid high-throughput diagnostic systems has led to the development of miniaturized hybridization and detection techniques that have created a new industrial standard, the microarray. Microarrays or DNA chips consist of PCR-amplified cDNAs or specific oligonucleotides fixed *in situ* on special carriers or arrays. Specific hybridization of labeled sample DNA onto fixed-capture nucleotides provides information about the quality and initial quantity estimates of potential transgenes (Freeman *et al*., 2000; Moore *et al*., 2002). In fact, microarrays enable the detection, identification, and quantification of large numbers of GMO varieties present in a sample in one single assay.

Imaging of DNA microarrays has mainly been based on use of organic dyes (fluorescence labels); however, these methods may suffer from problems that include photobleaching, low labeling efficiency, and so, subsequently, reduced sensitivity; nevertheless, several recently developed electrical, enzymatic, scanning force microscopy, capillary electrophoresis, nanoparticle, and optical detection methods have been considered and successfully applied to overcome such problems (Moller *et al*., 2000 and Muller *et al*., 2000).

Remarkably, compared with the total number of recently published studies introducing GMO detection methods, specifically adapted microarray systems will play a major role. For instance, by introducing peptide nucleic acid based arrays, multiplex PCR mixtures have been successfully identified on five transgenic DNAs (Germini et al., 2005). Another system is NAIMA or (NASBA Implemented Microarray Analysis) where NASBA stands for Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. It is a new target amplification approach

developed to detect and quantify the presence of DNA targets of low amount in a multiplex fashion. In principle, NAIMA is a two-step microarray based method. In the first step, multiple tailed primers are used to generate a template DNA in a single extension reaction. In the second step, NASBA amplification reaction is performed using a single pair of universal primers to anneal to the universal sequences created by the tailed primers. NAIMA allows qualitative and quantitative GMO analysis with equivalent sensitivity and specificity to qPCR. It allows the quantification of GMO DNA targets in the range of 0.1–25%; therefore, permitting reliable detection and quantification of GM content in samples (food, feed and seeds), according to the requirements of most countries' regulations where thresholds are established for GMOs labeling. Thus, this method is a proof of concept for developing high multiplexing amplification and detection systems (Morisset *et al*., 2008).

Available GMO microarrays allow the detection of species-specific DNA of plants and viruses, commonly used genetic construction elements, and specifically introduced genetic modifications for the identification of approved and non-approved plant varieties. For instance, one developed microarray allows the detection of three GMO screening elements (35S promoter, nos terminator and nptII gene) as well as nine GMOs (Leimanis *et al*., 2006).

As microarray technology has expanded, quantitative comparison of data within and across microarray platforms has proven difficult. The main reasons for this are a lack of universal references and the variety of data analysis methods in use. However, microarrays remain promising; they enable a broad range of unique nucleic acid profiling, allow for screening and quantification in one assay, and they are very flexible, as new varieties can be included in the screening procedure by adding additional sequences to the array (Van Hall *et al,*. 2000 and Moore *et al*., 2002). Therefore, common protocols should be adapted in GMO testing laboratories, to establish a universal microarray-based GMO testing, taking advantage of the high sensitivity and screening high throughput of microarrays.

1.3.4.1.5.4. Thermal cycling procedures

Ligase chain reactions (LCR) (Barany, 1991) have been introduced to employ either linear or exponential amplification by covalently bridging two adjacent primers through a heat-stable DNA ligase. Subsequent haptene-mediated detection of the ligated oligonucleotides enables the analysis of fewer than 100 target molecules (Kratochvil and Laffler, 1994). Reliable monitoring approaches have been established using a combination of PCR, LCR, and enzyme-immunoassay detection (PCR–LCR–EIA) when testing for dairy product adulteration (Klotz and Einspanier, 2001). A combined PCR–LCR method on a microarray platform has recently been successfully introduced for detection of five transgene events in food samples (Bordoni et al., 2005). This technique is most advantageous for discrimination between different genotypes using a single base exchange, and may be most valuable in screening transgene DNA. The possible robotic application of such combined assay systems should provide additional verification systems that utilize not only single-point mutations but also genetically modified regions within GMOs.

1.3.4.1.5.5. Isothermic amplification

The nucleic acid sequence-based amplification or NASBA technique mimics the retroviral strategy of RNA replication to accumulate cDNA and RNA (Guatelli *et al.*, 1990). After introducing an artificial T7 promoter sequence through the first primer, NASBA operates continuously by taking advantage of the isothermal mode of action of a T7-DNA-dependent RNA-polymerase amplifying the gene of interest determined by the primers. This procedure will finally achieve rapid, exponential nucleic acid amplification (≈1000-fold) within 1–2 h (Malek *et al.*, 1994). Comparable new techniques have been introduced, e.g. rolling cycle amplification (Lizardi *et al.*, 1998), ramification amplification (Zhang *et al.*, 1998), and strand-displacement amplification; all of these have their own advantages in the process of multiplying DNA or RNA using isothermal nucleic acid polymerization.

1.3.4.1.5.6. Nanoparticle and microfluidic techniques

Nano- and micro-technology is an innovative field of DNA research; which might remarkably accelerate the development of novel GMO detection methods. The great potential of nanotechnology has been discovered for clinical applications (Jain, 2005 and Kubik *et al.,* 2005). Two important developments that might increase the efficiency of GMO detection in routine applications are:

- nanoparticles
- microfluidic devices

Nanoparticles offer new dimensions in DNA detection due to their superior stability compared with fluorescence dyes, and the availability of different detection modes (Drummond *et al*., 2003). Advantageous fluorescence-free detection of specific DNA hybridization can be achieved by infrared absorption spectroscopy and by colorimetric or electrochemical methods using gold, silica, or carbon nanoparticles (Moses *et al*., 2004; Storhoff *et al*., 2004 a, b). A first practical application for the detection of GMOs using nanoparticles was developed in 2005 (Kalogiannu *et al.,* 2005), by which 35S promoter and nos terminator were screened using DNA biosensor.

Microfluidic systems enable reproducible detection and quantification of DNA (Auroux *et al.,* 2004). For example, several types of microfluidic 'lab-on-a-chip' technology are currently available, not only for simultaneous verification and quantification of PCR products (Birch *et al.,* 2001) but also for multiple PCR amplification on micro devices (Munchow *et al*., 2005). In particular, micro devices working practically with capillary electrophoresis chips have recently been introduced for GMO detection (Kim et al,. 2005) and enable analysis of 0.1% GMO content, starting with only 20 template molecules (Obeid et al., 2004). Specially developed functional piezoelectric affinity sensors can detect GMO DNA hybridization directly by means of oligonucleotides immobilized on electrode surfaces generating piezoelectric signals (Minunni *et al*., 2001), and thus specifically indicating the presence of transgenes. For sufficient assay sensitivity, however, prior DNA target amplification is usually necessary. Such

nanotechniques may provide the future platform for the detection and quantification of GMO DNA in a rapid and cost-effective manner on disposable material, thus limiting crucial cross-contamination.

1.3.4.1.5.7. Mass spectrometry of DNA

Conventional molecular biology approaches such as gel electrophoresis often lack accuracy and the possibility of high throughput automation. An alternative approach for the analysis of PCR products is mass spectrometry (MS). PCR products can be rapidly analyzed by use of MS-based methods, for example electro spray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight (MALDI–TOF). Both methods, which were originally developed to enable investigation of other organic polymers, e.g. proteins, allow the detection of non-volatile and thermally labile molecules that have molecular weights as low as 1-2 kDa (Bonfini *et al*., 2002). Application of these rapid and sensitive techniques to short DNA sequences and to genetic changes in plant and viral genomes (Amexis *et al.,* 2001) should lead to a dramatic reduction in analysis time (Larsen et al., 2001). DNA MS techniques have successfully been introduced in clinical studies and now enable accelerated mutation research (Gut, 2004). In addition, short DNA repeats were recently successfully analyzed by use of MS techniques for forensic purposes (Carey and Mitnik, 2002). Comparison of transgene and conventional genomes by using species-specific genome-fragment libraries for reference should enable rapid discrimination between GMO and non-GMO samples. Although MS analysis of DNA is currently limited by the molecular size of nucleic acids, these detection methods will become increasingly important as high-throughput applications become common.

1.3.4.1.5.8. Supplementary photon-driven monitoring methods

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was developed in the mid-1970s, and is the method of choice for the analysis of biomolecular nanostructures; it has been described as a reliable and rapid tool for detection of PCR products (Bjorling et al., 1998). The principle of FCS is the analysis of fluctuations of fluorescence intensity, and the technique is based on resolution of the thermal fluctuation of single molecules (one partner must be dye-labeled) by fluorescence measurement that is auto-correlated with the particle concentration. FCS-based quantitative PCR has the advantages of being sensitive and both time- and labor-saving, and hence is becoming increasingly important for single-molecule detection-based diagnosis (SMDD). Ultimately, the FCS method will most probably be used in a wide variety of biological applications. More recently, FCS-based PCR has been used in screening experiments, in which it utilizes the intermolecular aggregations of pathogenic nucleic acids (Walter *et al.* 1996). On the basis of recent SMDD data, this method of detection should enable analysis of genetic material, but without prior extensive PCR amplification (Kinjo and Rigler 1995 and Kask *et al.* 1999).

Surface plasmon resonance (SPR) is another prominent, yet label-free, photon technology suitable for monitoring intermolecular relationships in very small sample volumes. This optical technique enables detection and quantification of changes in refractive index (RI) in the vicinity of a sensor chip's surface to which ligands have been immobilized; this enables any interaction of biomolecules with the ligand to be detected (McDonnell, 2001). One side of a glass prism is coated with a very thin layer of metal to which a DNA probe (single strand) is attached. When a light beam passes through the prism the energy of the beam interacts with the cloud of electrons in the metal film, causing oscillation of electrons (=

Plasmon) (Alberts *et al.,* 2002). Reflection of the beam occurs at a certain resonance angle. When DNA binds to the metal film of the probe the composition of the molecular complex on the metal surface changes, thus causing a shift in reflection angle that is characterized as RI. By using SPR, the numbers of molecules bound in each complex can be determined.

In addition to its use in detecting different DNA molecules after PCR amplification (Kai *et al*., 1999), the method has been successfully used to detect GMOs in food samples after PCR amplification (Feriotto *et al*., 2002, 2003). A major advantage of the method is that it can be combined directly with miniaturized biosensor technology, thereby enabling DNA measurements to be made without previous probe labeling and in reusable continuous flow systems.

1.3.4.1.5.9. Biological monitoring approaches

In addition to the physicochemical methods described above, other strategies have been introduced for detection of DNA on the basis of biological effects of foreign genes within organisms. A technique which takes advantage of naturally occurring homologous recombination between two distant, but homologous, DNA fragments has been developed for the detection of transgenic targets by use of artificial microbial gene loci. In accordance with the so-called 'marker rescue' method, the finally surviving transformed microorganisms are grown and amplified in culture media, indicating a positive event (Contente and Dubnau, 1979). In principle, deficient mutant strains containing a homologous gene of interest, and a selective medium in which only the reconverted wild-type can survive, are provided. Subsequently, the GMO target can be detected by homologous recombination with the mutant possessing a functional promoter; this leads, after successful recombination, to bacterial growth in the selective medium. This technique was recently used to detect antibiotic resistance marker genes derived from environmental GMO plant material (de Vries and Wackernagel, 1998). Remarkable long-term persistence of functional gene fragments derived from GMOs has been monitored in soil with this technique (de

Vries *et al*., 2003). In the future, the technique – by using transformation events to detect GMO DNA from different sources – may lead to an interesting biological monitoring approach in which prior PCR amplification steps can be omitted.

In contrast, the so-called 'unintended effects' might be used to detect genetic modification directly within the GMOs. This new concept will go beyond the originally calculated genetic modification searching for non-premeditated changes in the expression pattern (Cellini *et al.* 2004). This means that integrated foreign genes may interact, via positioning effects, with the physiology of each transgenic organism. Remarkable metabolic changes might therefore occur, and could be recorded by differential measurement of random expression properties or distinct candidate transcripts. This would apply several differential profiling methods, for example the DDRT (differential display reverse transcription)-PCR technique, used to detect changing cDNA patterns within the GMO plant without a known nucleic acid target. High-throughput DNA techniques, like microarrays, are suitable only if the complete genome of the investigated organism is known. Metabolic and proteomic changes will also be monitored, supporting the evidence of such integral GMO analysis. New methods are currently under development to monitor such interactions, in contrast with the conventional physiological reaction after the transgene event occurs (Le Gall *et al.* 2003). This will call for sensitive, comprehensive, high-throughput systems capable of detecting multiple cellular properties, and should lead to a holistic insight that might illuminate the multiple biological interactions mediated by any desired genetic modification. Analysis of cellular RNA might therefore be an important means of detecting expression differences indicative of positioning effects within the genomes of transgenic and isogenic organisms.

1.3.4.2. Protein-based methods

Protein-based methods are immunoassays that employ antibodies to detect target antigens. Basically, they are represented by ELISA and Lateral flow sticks experiments (Holst-Jensen, 2001; Lubeck et al., 2001; Bonfini et al., 2002 and Querci et al., 2006). In the case of GMO testing, the target protein would be the newly expressed one. It is critical for the development of the immunoassays that highly specific antibodies directed against the target protein are available. It is also important that the sample or the protein of interest are not significantly degraded or denatured. Finally, it is noteworthy to take into consideration that the newly expressed protein may be neither expressed at the time of sample collection nor in all tissues.

Protein-based methods are trait-specific and thus cannot identify a GMO where several varieties may have the same trait such as the maize varieties Bt-176, Bt11, and Mon810 which contain the same Cry protein. In fact, since the same target protein can be found in different GMOs, antibody-based assays may not be discriminating. Therefore, immunoassays in general can be considered as screening methods.

1.3.4.2.1. ELISA

ELISA is the most common method of immunoassay which utilizes an enzyme-labelled immunoreactant (antigen or antibody) and an immunosorbent (antigen or antibody bound to a solid support). It aims at the detection of the specific proteins produced in the crop as a result of genetic modification. For example, in order to detect the presence of herbicide resistant traits, ELISA detects a specific protein that has been captured by an antibody formed for this protein. ELISA is faster and less expensive than PCR-based methods; however, as all protein-based methods, its detection capacities are hampered by the specificity of the immunoreactant/immunosorbent reaction, by the denaturation/degradation of the protein as well by the protein expression level in different tissues and at different times.

1.3.4.2.2. Lateral flow sticks

Dipstick formats (lateral flow sticks) can be used to detect GMOs in leaves, seeds, and grains. Paper strips or plastic paddles are used as support for the capture antibody and this is then the reaction site. The strip/paddle is dipped in vials containing the different solutions. Each dip is followed by a rinsing step. The final reaction includes a color change in the vial, where the strip/paddle is placed. Recent development of dipstick format has led to lateral flow techniques where reactants are transported through the channels of a membrane by capillary forces. One single step is enough for performing the assay, and controls for reagent performance are included. Antibodies specific to the foreign protein are coupled to a color reagent and incorporated into the lateral flow strip. When the lateral flow strip is placed in a small amount of an extract from plant tissue that contains foreign protein, binding occurs between the coupled antibody and the protein.

A sandwich is formed with some, but not all the antibody that is coupled to the color reagent. The membrane contains two capture zones, one captures the bound foreign protein and the other captures color reagent. These capture zones display a reddish color when the sandwich and/or non-reacted colored reagents are captured in the specific zones on the membrane. The presence of a single line (control line) on the membrane indicates a negative sample and two lines indicate a positive sample. Lateral flow techniques are qualitative or semi-quantitative. By following appropriate sampling procedures, it is possible to obtain a 99% confidence level of < 0.15% GMO for a given lot.

Lateral flow sticks present the same disadvantages as protein-based methods; however they are useful, for they are quick, practical and can be directly applied in the field.

1.3.4.2.3. Western blotting

Western blotting is a method for qualitative and semi-quantitative testing of proteins (Nicholl 2002). In GMO testing, it is more suitable for research than for inspection and can be used for poorly soluble proteins. It involves the transfer of electrophoretically-separated protein molecules to membranes. The membrane is then probed with antibodies to detect the protein of interest, in a similar way to immunological screening.

1.3.4.2.4. The use of chromogenic substrates/histochemical assays

The use of chromogenic substrates in genetic screening methods has been an important aspect of the development of the technology. The most popular system uses the compound X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside), a colorless substrate for B-galactosidase. The enzyme is normally synthesized by E. coli cells when lactose becomes available. However, induction can also occur if a lactose analogue such as iso-propyl-thiogalactoside (IPTG) is used. This has the advantage of being an inducer without being a substrate for B-galactosidase. On cleavage of X-gal a blue-colored product is formed, thus the expression of the LacZ (B-galactosidase) gene can be detected easily. This can be used either as a screening method for cells or plaques, or as a system for the detection of tissue-specific gene expression in transgenic organisms.

Reporter genes are an important tool in plant research. They have been most commonly used to study the activity of regulatory elements, such as promoters, enhancers, introns, and transcription terminators. Beta-glucuronidase (GUS) activity can be measured easily and quantitatively by spectrophotometric and fluorimetric methods. The tissue-specific localization of GUS can be visualized in a histochemical assay. The chemical reaction that allows the histochemical detection of GUS activity occurs in two steps: B-glucuronidase catalyzes the hydrolysis of the substrate X-Gluc and liberates one molecule of 5-bromo-4-chloro-indoxyl that is not colored. The indoxyl then undergoes an oxidative dimerization that results in the blue coloration. Dimerization is stimulated by

atmospheric oxygen and can be enhanced by using an oxidation catalyst, such as a potassium ferricyanide/potassium ferrocyanide mixture. The ferricyanide/ferrocyanide is therefore important in the histochemical assay because by enhancing dimerization, it slows diffusion of the indoxyls into neighboring cells, which is a potential source of artifacts in this assay (Falciatore *et al.* 2002).

1.3.4.3. Herbicide bioassay

Herbicide-tolerant crops are cultivated crop plants that have been altered to be able to survive application(s) of one or more herbicides by the incorporation of certain gene(s), via either genetic engineering or traditional breeding techniques (Adrian *et al*., 2003). For example, the CP4 EPSPS gene has been inserted, via genetic engineering, into crops (e.g. soybean, canola, cotton, and corn/maize) to make them tolerant to glyphosate herbicides. Corn has also been transformed with the PAT gene to have resistance to glufosinate herbicides. Other corn lines, such as those with the **IT** or **IR** genes, are tolerant to imidazolinone herbicides. Imidazolinone tolerance has been developed via traditional breeding techniques.

The herbicide bioassay is a test performed on plants or seeds that screens for tolerance to a specific herbicide (Lubeck, 2001). The plants/seeds are exposed to the herbicide and, after a period of growth time, are rated as tolerant or susceptible. Standard herbicide bioassays methods include: substrate imbibitions, pre-soak, or seedling spray. Whereas PCR looks for presence of the desired DNA and an ELISA finds the protein coded for by that DNA, the bioassay determines the actual effect or activity of the gene in a living plant. The bioassay typically requires less special equipment than other genetic tests and can be relatively easy to integrate into a conventional seed laboratory. However, bioassays require separate tests for each trait in question and at present the tests will not detect non-herbicide tolerance traits. Therefore, the tests are only of limited value for inspection authorities.

Summary

DNA-based techniques have the key advantages of high sensitivity and robust and rapid operation, while satisfying the prerequisites of careful experimental design to avoid false-negative and/or false-positive results. Today, real-time PCR seems to be the best-developed and most suitable GMO monitoring system, and highly sensitive, specific, reliable, quantitative, and rapid detection is available.

However, these DNA-based assay systems are still cost-intensive and require sophisticated instrumentation and laboratory equipment for their operation. Further developments may lead to simple and less expensive methods for DNA screening adjusted to market requirements, especially with the background of commercial availability of rapidly growing numbers of different GMOs. This might require the use of rapid test-strip kits for initial screening procedures, which will ease the burden on somewhat limited government food-monitoring budgets. In the future, analysis of GMOs by use of DNA technology will continue to evolve, and combination with other innovative techniques (e.g. micro- and nano-systems) will enable holistic and rapid analysis satisfying the great demand for food inspection. Although DNA related methods will clarify food production processes in relation to GMO components, natural DNA is present in virtually all daily food components, and any toxicological fears about such food-borne DNA can be excluded. On this basis, a number of safety considerations of transgenic DNA have been discussed (Jonas et al. 2001) and are of continuing scientific interest. In addition, developed assay methods will not only be used to detect residual GM DNA, but also to examine its biological potency with regard to possible environmental interactions. In this context, possible horizontal gene transfer from GMOs to gut bacteria, for example, is still a topic of ongoing scientific discussion. European research projects, which have dealt extensively with this topic, are now providing sufficient risk assessment results for public discussion (van den Eede *et al.* 2004). Investigating the fate of GM gene fragments, and their biological effects, by use of the newest DNA technology, will therefore enable sustainable risk assessment of transgenic food and feed.

PART 2
Laboratory Manual for the Practical work on "GMOs Detection and Biosafety"

2.1. Biosafety Guidelines for Laboratories

In general, the basics of Good Laboratory Practices (GLP) in microbiology laboratory should apply to all concerned laboratories.

1- Laboratory personnel must receive instructions on the procedures conducted in the laboratory.
2- Never do direct mouth pipetting of infectious or toxic fluids; use a pipettor.
3- Do not blow infectious material out of pipettes.
4- Do not prepare mixtures of infectious material by bubbling expiratory air through the liquid with a pipette.
5- Avoid using syringes whenever possible.
6- Sterilize discarded pipettes and syringes in a pan where they were first placed after use.
7- Before centrifuging, inspect tubes for cracks.
8- Use centrifuge cups with screw caps or equivalent.
9- Avoid decanting centrifuge tubes; if you must do so, afterwards wipe off the outer rim with a disinfectant. Avoid filling the tube to the point that the rim ever becomes wet with culture.
10- Sterilize all contaminated discarded material.
11- Working surfaces must be decontaminated using soap and alcohol after each working day.
12- Develop the habit of keeping your hands away from your mouth, nose, eyes and face. This may prevent self-inoculation.
13- Hand wash is obligatory when contamination is suspected, after handling viable materials, and also before leaving the laboratory (at least one hand wash sink should be available).

14- Avoid smoking, eating, chewing, drinking, storing of food and applying cosmetics in the laboratory.
15- Make special precautionary arrangements for respiratory, oral, intranasal, and intratracheal inoculation of infectious material.
16- Laboratory coats are obligatory and should be removed when exiting the lab.
17- Wear only clean laboratory clothing in the dining room, library and other non-laboratory areas.
18- Waste products must be decontaminated by incineration or by autoclaving.
19- Avoid contact with GMO's and other exotic biological agents. Disposable gloves should be worn when handling such items.
20- Laboratory door should be closed at all times.
21- Working with fume-producing chemicals must be under the laboratory hood.
22- Biohazard warning signs should be always posted in labs.
23- Materials for autoclaving or incineration must be transported without spillage in robust, leak-proof containers.
24- Effective disinfectants must be available for routine disinfection and for immediate use in the event of spillage.
25- To ensure safety in laboratories, a person must be appointed in every laboratory to make sure that Good Laboratory practices are strictly followed.

Laboratory Practices & Safety Guidelines

1. Be patient while you are working. Do not start an experiment unless you ascertain all the steps.
2. Do not use an equipment unless you ascertain how to use. Use the laboratory equipment properly. If you do not know how to use, see the equipment user's manual or ask others.
3. Do not touch any equipment or place with contaminated gloves.
4. Once you spill or contaminate any toxic material, antibiotics or carcinogens, decontaminate the area or equipment immediately. If you do not know how to decontaminate, ask others.
5. Wear gloves and a laboratory coat while you handle any toxic or carcinogenic chemicals (e.g., EtBr, CsCl, Phenol, etc.).
6. Wear eye or face protection under UV.
7. If any toxic chemicals, antibiotics or carcinogens is spilt on body or clothes, immediately remove the contaminated clothing and wash small spills under water for at least 5 min. Spills on legs can be rinsed in the sink. Do not hesitate to use the shower in the laboratory for large spill. Do not rinse contaminated skin with alcohol.
8. After you use any chemical, enzyme or solvent, etc., bring it back to the place where it was.
9. Before you use the last remains, a last bottle of a chemical, tubes, etc., ask to purchase the necessary items.
10. Most enzymes are expensive. Keep the enzymes at -20C and do aliquots.
11. Use a new pipette tip to remove the necessary amount of any enzyme.
12. Laboratory equipment is also very expensive and, sometimes (e.g. in the case of centrifuges) potentially dangerous.
13. Please don't use any equipment you are unfamiliar with, without asking for help!

14. Ethidium bromide is very toxic! It is a potential carcinogen and must never be handled without gloves. Gloves should be worn at all times. Its handling is only allowed in very restricted areas; it evaporates when it gets warm (e.g. when pouring agarose gels). Ethidium bromide is not allowed in the media kitchen (especially not in the microwave!), in the tissue culture lab, in the Molecular Biology lab andoutside the lab fume hood.
15. Ultraviolet (UV) light is dangerous to eyes and exposed skin. Protective eyewear (goggles) should be worn at all times when using a UV light source unless other shielding is available.
16. Of course, hands should be washed after any laboratory practices and especially before any food is eaten.
17. All workers / participants should know the procedures for responding to emergencies in the institute.
18. Wear protective equipment including safety goggles, gloves, and long – sleeve lab coat. It is very smart not to wear contact lenses but glasses.
19. When working with liquid nitrogen you must wear goggles.
20. All students should always be aware of the locations of eyewash fountains and emergency showers.
21. It is well known that eating, drinking and smoking is not allowed and the disregard of this rule will cause the immediate exclusion and punishment.
22. Women have to notify the course leader about a pregnancy, this has to be kept confidential.
23. In medical emergencies, lab workers should follow these general guidelines:
    - Remain calm.
    - Initiate life-saving measures if required.
    - Call for emergency response.
    - Do not move injured person unless there is danger of further harm.
    - Keep injured person warm.

24. The range and quantity of hazardous substances used in laboratories require pre- planning to respond safely to chemical spills.
25. Biological spills outside biological safety cabinets will generate aerosols that can be dispersed in the air throughout the laboratory.
26. Wear disposable gloves.
27. Soak paper towels in disinfectant and place over spill area.
28. Place towels in plastic bag for disposal.
29. Clean spill area with fresh towels soaked in disinfectant.
30. Please be aware that transgenic organisms should never get in contact with environment. Never pour them into the sink without autoclaving.
31. Some further important and general rules :
    - Never run on the floor.
    - Open doors carefully.
    - Carry organic solvents in a bucket.
    - Clean your working place after you have finished your work.
    - Spoiling of glass ware, bacterial strains or chemicals can sabotage the work of all people in the lab for weeks, therefore:
        - Never put surplus chemicals back into the storage box.
        - Clean glass ware throughout, best using the dishwasher
    - Gel supply, stirring bars, and spatula have to be cleaned by hand immediately. First they are cleaned with soap, followed by running tab. water and distilled water.

2.2. Biolistic transformation system of wheat

- **Solutions for Coating Particles**

- Anhydrous 100% Ethanol: Open a new bottle.

- Sterile Distilled Water: Use milli-Q Water, autoclaved.

- DNA: Resuspend to a final concentration of 1 µg/µl in TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0)

- 2.5 M CaCl2:
  36.76 g per 100 ml H2O
  Filter sterilize
  Store at -20°C

- 100 µM Spermidine
  14 µl spermidine free-base
  986 µl sterile H2O
  Store at -20°C up to 3 months

- **DNA Coating of Tungsten Particles**

Tungsten particles are extremely irregular in shape and heterogeneous in size and although different mean sizes (ranging from 0.5 to 2.0 µm) are available, their size distributions overlap extensively. The advantages of tungsten are that it is very inexpensive, it is available in numerous sizes, each size class represents a board spectrum of particles diameters, and it is relatively easy to coat with DNA. The disadvantages are that it is potentially toxic to certain cell types, it is subject to surface oxidation that can alter DNA binding, it catalytically degrades the DNA bound to it over time, and it is highly heterogeneous in shape and size, which prevents optimization of size for a particular cell type.

For 20 shots:

- Use 10 mg tungsten powder (Bio-Rad Tungsten M-17)
- Add 1 ml 100% ethanol, anhydrous. Open a new bottle.
- Heat at 95°C for 2 hours.
- Centrifuge for 10s in microcentrifuge on highest speed.
- Decant supernatant and replace with 1 ml fresh 100% ethanol.
- Sonicate for 5 minutes, 3 times. (Boiling and sonicating remove surface oxidation).
- Centrifuge for 10s. Can be stored overnight at -20°C.
- Remove ethanol. Resuspend particles in 1 ml sterile distilled water. Centrifuge 10s.
- Remove water and repeat washes 3 more times. It is critical to remove all ethanol with repetitive washes in water to avoid the formation of particles aggregates (clumps).
- Resuspend final pellet in 200 µl sterile distilled water.

Sample preparation for 5 shots:

- Add in order on ice:

  50 µl tungsten solution

  10 µg DNA in TE (1 µg/ µl)

  50 µl 2.5 M CaCl2

  20 µl 100 µM spermidine (free base)
- Vortex for 30 minutes in cold room
- Add 200 µl ethanol.
- Centrifuge 10s in microfuge at high speed.
- Remove supernatant.
- Add 200 µl ethanol and resuspend completely. Make sure all clumps are dispersed. Repeat ethanol washes 3 times.
- Resuspend final pellet in 30 µl ethanol.
- Dispense 5 µl onto each flier for shooting.

DNA Coating of Gold Particles

Gold particles are available in a limited range of sizes, but are much rounder and also more uniform in size than tungsten. A principal advantage of gold particles is their uniformity (relative to tungsten particles), which allows for some optimization of size relative to a given cell type. More importantly, gold is biologically inert. A major disadvantage of gold is that it is expensive. Gold particle dispersions are not stable in sterile aqueous suspensions, and over a period of time the particles agglomerate irreversibly. Therefore, particles should be weighed out fresh on the day of bombardment (Rasco-Gaunt *et al.,* 1999)

For 16 bombardments:

- Weigh out 1 mg 0.6 µm gold particles.
- Re-suspend in 100 µl ethanol. This helps kill any bacteria and creates a positive charge on the particles.
- Quick spin at high speed in microfuge.
- Remove supernatant and discard.
- Wash particles with 1 ml dsH2O to remove ethanol.
- Quick spin.
- Remove supernatant.
- Re-suspend particles in 50 µl sterile water.
- Add 50 µl 2.5 M CaCl2. Pipette up and down to mix.
- Add 20 µl 100 mM spermidine. Pipette up and down to mix.
- Add 5 µg DNA (usually 5 µl). Pipette up and down to mix.
- Vortex 10 minutes at moderate speed.
- Spin at lowest possible speed in microfuge for 5 minutes.
- Remove supernatant and discard.
- Wash pellet with 500 µl 100% ethanol (anhydrous- open a new bottle).
- Remove supernatant and discard. (Spin at lowest speed if pellet is disturbed).

- Resuspend pellet in 85 µl 100% ethanol.
- Sonicate 10s immediately before aliquoting to flyers.
- Use 5 µl per shot.

Preparing Samples

The explants used will depend on the species to be transformed, as will the medium selected. Generally, use shoot induction medium (SIM) for dicots. For monocots, explants are generally embryos (either mature or immature) or callus suspension cultures, and are often bombarded on callus induction medium (CIM).

Preparation of explants

- Ear collection and surface sterilization
- Collect ears at approximately 12-16 days post-anthesis, a few seeds can be opened at the time of collection to determine the size and texture of the embryos, which should be 0.8-1.5 mm in length and translucent in appearance.
- Surface sterilize by rinsing in 70% (v/v) aqueous ethanol for 1 minute then 15 minutes in 10% (v/v) Domestos bleach solution (Lever) with gentle shaking. Rinse with sterile distilled water at least three times.
- Note, due to asynchronous development, only half or two third of the seeds on any one ear will be suitable, the seeds nearest to the peduncle are generally younger and smaller.
- Isolation of immature embryos
- Isolate the embryos from the seed under a stereo microscope in a sterile environment using a sharp scalpel.
- Remove and discard the embryo-axis first then isolate the remaining portion of the embryo which is now referred to as the scutellum.
- Plate scutella with the axis side (now removed) down onto semi-solid inoculation medium in 55 mm Petri dishes, about 50 scutella per plate.

Isolation of immature embryos

- Place scutella with the axis side (now removed) down in contact with the semi-solid callus induction medium (CIM) in 90 mm Petri dishes, thereby exposing the scutellum to bombardment. Put 50 scutella explants per plate and use three to five Petri dishes for bombardment per treatment. Seal the plates with parafilm and incubate in dark at 26°C for approximately 24 hours before bombardment. Histochemical GUS assays were conducted 2 days after bombardment.
- For shoot regeneration of scutellum cultures subjected to standard and optimised bombardment conditions, scutella were spread ten per plate on callus induction medium. After 3 weeks, the calluses were transferred to solidified RZM medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D and 5 mg/l Zeatin for shoot regeneration. Cultures were incubated at 26°C under a 12-h photoperiod. The numbers of calluses producing shoots were assessed after 3 weeks of shoot induction.
-

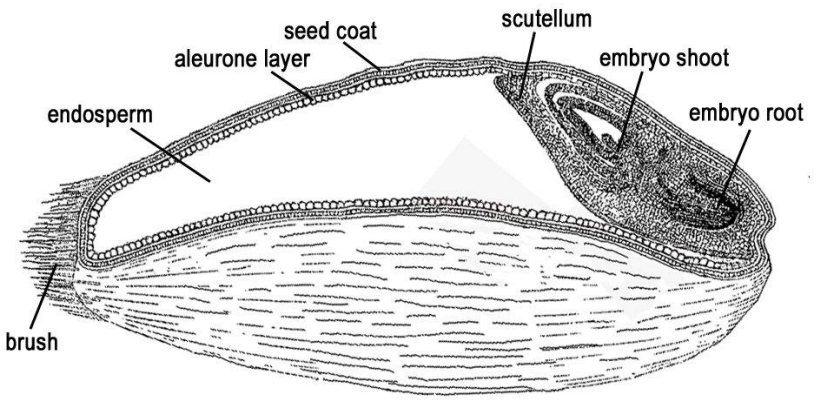


Fig. Anatomy of Wheat Seed

- **Shooting Explants**

1. For each shot you will need one rupture disc (900-1100 PSI), one macrocarrier (flier), and one stopping screen.
2. Before shooting, autoclave all stainless steel parts of the gun (rupture disk holder, stopping screens, macrocarrier holders).
3. Soak acetate components (fliers and rupture disks) and capplug in 70% ethanol for ≥ 30 minutes.
4. Keep rupture disks in 70% ethanol, cover dish so ethanol doesn't evaporate. Remove fliers from ethanol, and air-dry completely.
5. Using sterile forceps, load fliers into macrocarriers holders. Aliquot DNA to fliers, allow to air-dry completely.
6. Wash the interior of the gun with 70% ethanol.
7. Wash all other components (launch assembly, lid, torque wrench and plate holder) with 70% ethanol. Allow all components to air-dry before use.
8. Rinse gloved-hands liberally with 70% ethanol.
9. Using good aseptic technique, handle all small components with sterile (flamed) forceps.

Set up Launch Assembly:

Stopping screen

Flier—upside down

Lid on tight

Set up Blaster (rupture disk and holder):

Rinse hands with 70% ethanol

Rupture disk in holder

Blaster in chamber

Tighten with torque wrench

Set up Bomb:

Put in the Launch Assembly

Put in the plate of explants (lid off)

Close the door

Turn on vacuum – goes to 28 in. Hg.

Switch vacuum to hold

Press and hold FIRE

Wait for pop, release FIRE

Release vacuum – to 0 in Hg

Open door and remove plate

Next bomb:

Remove Launch Assembly and disassemble

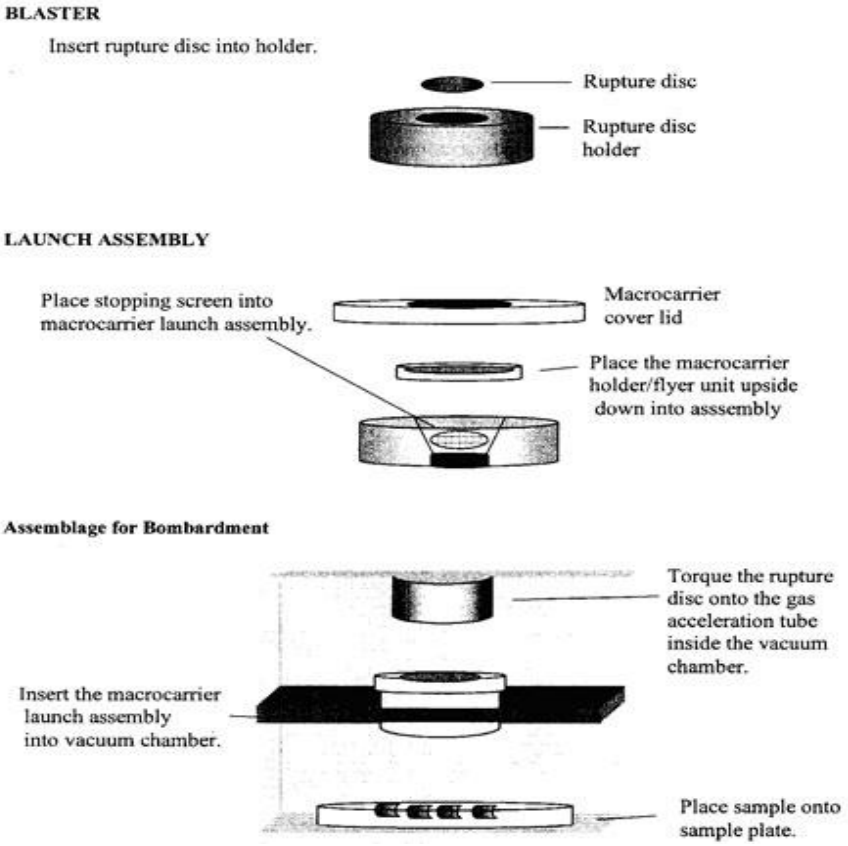
Remove Blaster and empty broken disk

Back to set up Launch Assembly.

When done bombing, wrap plates with saran Wrap and incubate plates in appropriate chamber.

For selection, incubate 2 days at 25°C, then transfer to SIR + Kan (or other selective agent depending on construct).

Biolistic® -PDS-1000/He Particle Delivery System



Above: Sketch of how to prepare the gene gun for shooting.

- **Media for plant tissue culture**

Plant tissue culture media are prepared from stock solutions at double strength to allow the addition of an equal volume of gelling agent; phytagel for induction medium, agar gel for RZM and RM media. Gelling agents are also prepared at double strength (phytagel at 4 g/l and agar gel at 10 g/l) and autoclaved at 121°C for 20 min.

Composition of double-strength culture media. All concentrations are shown double strength except for the supplements added after pH adjustment and sterilisation which are shown at final concentrations.

Component	Inoculation (/L)	CIM (/L)	RZM (/L)	RPPT (/L)
MS macro salts (x10)	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml
L7 micro salts (x1000)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
FeNaEDTA (x100)	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
MS vitamins (x1000)	2 ml	2 ml	-	-
Vitamins/Inositol (x200)	-	-	10 ml	10 ml
Inositol	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Glutamine	1 g	1g	-	-
Casein hydrolysate	200 mg	200 mg	-	-
MES	3.9 g	3.9 g	-	-
Maltose	80 g	80 g	60 g	60 g
	pH adjusted to 5.8 then autoclaved		pH adjusted to 5.7 then	
filter sterilized				
2,4-D	2 mg	0.5 mg	0.1 mg	-
Picloram	2.0 mg	2.0 mg	-	-
Acetosyringone	200 µM	-	-	-
Timentin	-	160 mg	160 mg	160 mg
Zeatin	-	-	5 mg	-
PPT	-	-	-	2-4 mg

CIM: Callus Induction Medium; **RZM**: Regeneration Zeatin Medium; **RPPT**: Regeneration medium with selective agent.

- **Stock solutions for basal culture media**

MS Macrosalts (x10)

16.5 g/l NH_4NO_3

19.0 g/l KNO_3

1.7 g/l KH_2PO_4

3.7 g/l $MgSO_4 . 7H_2O$

4.4 g/l $CaCl_2 . 2H_2O$

Note: Dissolve each component in distilled water separately before mixing. Autoclave at 121°C for 20 min and store at 4°C.

L7 Microsalts (x1000)

15.0 g/l $MnSO_4$

5.0 g/l H_3BO_3

7.5 g/l $ZnSO_4 . 7H_2O$

0.75 g/l KI

0.25 g/l $Na_2MoO_4 .2H_2O$

0.025 g/l $CuSO_4 .5H_2O$

0.025 g/l $CoCl_2 .6H_2O$

Note:

$MnSO_4$ may have various hydrated states which will alter required weight.

For $MnSO_4.H_2O$, add 17.05 g/l,

for $MnSO_4.4H_2O$, add 23.22 g/l,

for $MnSO_4 .7H_2O$, add 27.95 g/l.

Prepare 100 ml microsalt stock solution at a time . Filter sterilize, and store at 4°C.

MS Vitamins (minus Glycine) (x1000):

g/l Thiamine HCl

0.5 g/l Pyridoxine HCl

0.5 g/l Nicotinic acid

Prepare 100 ml at a time. Filter sterilize, and store at 4°C

Vitamins/Inositol (x200):

40.0 g/l Myo-Inositol

2.0 g/l Thiamine HCl

0.2 g/l Pyridoxine HCl

0.2 g/l Nicotinic acid

0.2 g/l Ca-Pantothenate

0.2 g/l Ascorbic acid

Filter sterilize and store at -20°C in 10 ml aliquots.

Supplements:

- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg/ml in ethanol/water (dissolve powder in ethanol then add water to volume). Filter sterilize, and store at -20°C in 1 ml aliquots.
- Zeatin mixed isomers (10 mg/ml), dissolve powder in small volume 1 M HCl and make up to volume with water, mix well/vortex. Filter sterilize, and store at -20°C in 1 ml aliquots.
- Picloram (1 mg/ml), dissolve picloram in water, filter sterilize and store at -20°C in 2 ml aliquots.
- PPT (10 mg/ml) (Glufosinate ammonium), dissolve in water, mix well/vortex, filter sterilize and store at -20°C in 1ml aliquots.

2.3. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of chickpea

Time schedule:

Day 1	Seed sterilization
	Bacteria cultures
Day 2	Transformation (inoculation)
	Co-cultivation
Day 6	Washing of the explants
	Regeneration on subculture 1 media
Day 13/14	Regeneration and initial selection on Sub 2 media
Day 35	Selection on Sub 3 media
Day 49	Selection on Sub 4 media
Day 63	Selection on Sub 5 media
Day 77	Selection on Sub 6 media
Day 91	Selection on Sub 7 media
Day 105	Selection on Sub 8 media
Day 119	Selection on Sub 9 media
Day 133	Selection on Sub 9 media
Day 147	Rooting on HR media
	or grafting

Procedures

Day 1:

- Seed sterilization and bacteria culture preparing bacteria culture
- Weigh seeds.
- Transfer seeds to a flask and rinse them with tap water 2 times.
- Surface sterilize them in 70% ethanol for 1 min., shake well and cover the flask with aluminum foil.
- Sterilize seeds in pure Clorox for 20 minutes on the shaker (≤ 150 rpm).
- Rinse three times with sterile water and then soak them overnight in 1L sterile water to which you add 10 ml of 2M CaCl2 solution.
- Initiate *Agrobacterium* liquid cultures by adding ~ 400 µl of a standard glycerol inoculum to 25 ml plus antibiotics.
- Incubate at 27-29°C, shaking (150 rpm) for 12-24 hours (to reach an OD >1 (Abs = 600 nm).

Day 2:

- Transformation and cocultivation
- Pellet the *Agrobacterium* culture at 4500 g for 10 minutes at 4 °C and resuspend in 20 ml single-strength inoculation medium (Agro-suspension) supplemented with 200 µM Acetosyringone.
- Cut seeds in half and carefully remove the embryos, collect embryos in sterile water.
- Place the bacteria-suspension in a small petri dish. Cut the shoot at about 1mm from the root-tip of embryos (drop the embryos in a drop of bacteria-suspension and keep the blade wet when you cut), Change the blade after every 60 embryos.
- Incubate the decapitated embryos in the bacterial culture for 2-4 hours.

- Discard the bacterial-suspension and transfer the embryos onto filter paper blotted wet on co-cultivation medium (CCCP), incubate the plates in the dark at 21 ºC for 4 days.

Day 6:

- Regeneration on Subculture1 medium
- After co-cultivaton step, cut the curved part of embryos, and then transfer them to sterile Falcon tube.
- Rinse the embryos in 35 ml distilled water for three times.
- Thereafter, immerse the embryos in 150 mg/l ticarcillin solution for 20-60 min.
- add 25 ml water with 37.5 µl of Ticarcillin stock and leave them.
- Blot them dry on sterile filter paper (remove the excess solution), and then culture them under light on subculture1 for 7-9 days at 21-25ºC.

Day 13/14:

- Regeneration and Initial selection on Sub2
- Transfer the embryos (explants) onto fresh subculture 2 medium, incubate them for 21 days under the previous conditions.

Day 35:

- Selection on sub 3 and sub 4 media
- Remove the brown or the dead tissue from the base.
- Divide the explants into three parts which are originated from the cotyledonary buds and the apical meristem; Do not place more than 9-10 explants per Petri dish.
- Incubate under the previous conditions for two weeks.

Day 49:

- Selection 2 on Sub. 4
- Remove the dead tissue and subculture on fresh selection media up to subculture10 with two weeks interval.

Day 147:

- Rooting on HR medium
- Subculture the putative transgenic explants on rooting medium for three weeks.
- Move them to soft agar media if roots are formed. When roots are ok move them to sterile peatmoss for hardening.

Grafting of shoots

Mostly, it is difficult to induce the roots by hormones on chickpea, the problem was solve by micro-grafting on non-transformed rootstock as following:

- Sterilize chickpea seeds and germinate them on ½MS medium; in the dark for five days at 25 º C.
- Cut off the epicotyle of the seedling 1-1.5 cm above the cotyledonary node and split the remaining stem with a longitudinal cut.
- Trim the base of transformed shoot like V shape, then insert it between the split epicotyl of the seedling.
- Remove all secondary shoots which arise from the cotyledonary node of the non transformed seedlings during the following days.
- Transplanting in soil. (Krishnamurthy *et al.,* 2000)

- **Media for plant tissue culture**

DKW-C Stock I (x 10)

Chemical	Formula	mg/l media	g/l
Calciumchloride	$CaCl_2$	149	1.49
Magnesium sulfate	$MgSO_4.7H2O$	740	7.4
Potassium sulfate	K_2SO_4	1559	15.59
Ammonium nitrate	NH4NO3	1416	14.16
Potassium phosphate	KH_2PO4	265	2.65
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2.4H2O$	1968	19.68

DKW-C Stock II (x 100)

Iron stock	Fe-Na-EDTA	44.63	4.46
Manganese sulphate	$MnSO_4.H2O$	33.5	3.35
Zinc sulphate	$ZnSO_4.7H2O$	9.22	0.922
Boric acid	H_3BO_3	4.8	0.48
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39	0.039
Cupper sulphate	$CuSO_4.5H_2O$	0.25	0.025

DKW-C stock III (x 100)

Myo-inositol	100	10
Nicotinic acid	1	0.1
Glycine	2	0.2
Thiamine	2	0.2

Microsalts solution (x 100)

Manganese sulphate	MnSO4.H2O	1.69
Iron stock	Fe-Na-EDTA	4
Zinc sulphate	ZnSO4.7H2O	0.86
Boric acid	H3BO3	0.63
Sodium molybdate	Na2MoO4.2H2O	0.025
Cupper sulphate	CuSO4.5H2O	0.0025
Cobalt chloride	CoCl2.6H2O	0.0025
Potassium Iodide	KI	0.083

Components of media culture

Item	Agorsuspension	CCCP	Sub1	Sub2	Sub 3+4	HR
MS salts	500 ml package	-	-	-	-	-
DKW-C stock I	-	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
DKW-C stock II	-	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
DKW-C stock III	-	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
MS microsalts	1.5 ml	3 ml	-	-	-	-
B5 vitamins	5 ml	10 ml	-	-	-	-
Sucrose	7.5 g	15 g	30 g	30 g	30 g	20 g
Glucose	7.5 gr	15 g	-	-	-	-
Aceosyringone	5 ml	-	-	-	-	-
TDZ (0.5 mg/ml)	110 µl	22 µl	-	-	-	-
BAP	-	-	-	2 ml	2 ml	-
IBA	-	-	-	10 µl	10 µl	2.5 ml
MES	-	-	-	1 g	1 g	1 g
PVP	-	-	-	-	-	-
Phytagel	-	0.2 %	0.3%	0.3%	0.3%	0.8 %
Agar	-	-	-	-	-	-
pH	5.7					5.8
Ticarcillin	-	-	150 mg	150 mg	150 mg	-
PPT	-	-	-	-	5-10 mg	-

2.4. DNA based methods for GMO detection

The source of the below methods is the European Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed: JRC/EURL-GMFF.

Samples

During the training course, the unknown samples (Table 1) are extracted and used for both PCR and real-time PCR. In addition, certified reference materials (CRMs) are used as standards in real-time PCR. Extraction blanks and positive extraction controls will be included during extraction; no template control and negative and positive target controls will be run in PCR and real-time PCR.

Table 1. List of Samples distributed to the participants

Sample Type	Code	Group
Feed sample	S1	1
Soya feed 1, Argentina	A5	
Soya feed 2, Argentina	A4	
Imported soya, oil factory	A6	
Feed sample	S2	2
Soya seeds 1, Agri Research Center, Aleppo	Sb-321	
Soya seeds 2, Agri Research Center, Aleppo	Sb-330	
Cultivated soya, Agri Research Center, Aleppo	Sb-304	
Maize, Argentina	M16	3
Feed soya 1 (poultry), Kefernabel	S3	
Feed soya 2 (poultry), Kefernabel	S4	
Maize sample	M0	
Canned Food, Soumar	C1	1
Canned Food, Hana	C2	2
Canned Food, Zeina	C3	3

2.4.1. DNA extraction (CTAB protocol)

Equipment

All of the equipment must be sterilized prior use and any residue of DNA must be removed.

In order to avoid contamination, barrier pipette tips that are protected against aerosol should be used.

- Instruments for size reduction like a sterile surgical blade or mortar
- Water bath or heating block
- Microcentrifuge
- Micropipettes
- Vortex mixer
- 1.5 ml microcentrifuge tubes
- Spatulas
- Balance capable of 0.01 g measurements
- Loops
- Rack for microcentrifuge tube
- Vacuum desiccators to dry DNA pellets (optional)

Reagents

All chemicals should be of molecular biology grade. Deionised water and buffers should be autoclaved prior to use. In addition all chemicals should be DNA and DNase free.

- Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- Chloroform
- Isopropanol
- Na_2EDTA
- Ethanol

- NaCl
- Proteinase K
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl)
- Sterile deionised water

CTAB-buffer

20 g/l CTAB	20 g
1.4 M NaCl	82 g
0.1 M Tris-HCl	15.75 g
20 mM Na_2EDTA	7.5 g

- Add 500 ml of dionised water
- Adjust pH to a value of 8.0 with 1N NaOH
- Fill up to 1000 ml and autoclave

CTAB-precipitation solution

5 g/l CTAB	1 g
0.04M NaCl	0.5 g

- Add 100 ml of dionised water.
- Adjust pH to a value of 8.0 with 1N NaOH.
- Fill up to 200 ml and autoclave.
- Store solution at 4 °C max. 6 months.

NaCl 1.2 M

- Dissolve 7.0 g of NaCl in 100 ml deionised water.
- Autoclave and store at room temperature.

Ethanol-solution 70 % (v/v)

70 ml of pure ethanol are mixed with 30 ml of sterile deinoised water.

Proteinase K 20 mg/ml

Store at -20 °C.

Procedure

The procedure requires sterile conditions. Contaminations may be avoided during sample preparation by using single-use equipment, decontamination solutions and by avoiding the formation of dust.

- Moisten 200 mg of sample with 300 µl of sterile deionised water in a 2 ml tube.
- Mix with a sterile loop until homogeneity is reached.
- Add 700 µl of CTAB-buffer, pre-warmed to 65 °C, mix with a loop.
- Add 10 µl of Proteinase K (20 mg/ml), mix smoothly and incubate at 65°C for 30 min.
- Centrifuge for 10 min at 12000 g.
- Transfer supernatant to a 2ml tube containing 500 µl of chloroform, shake for 30 sec.
- Centrifuge for 15 min at about 12,000 g until phase separation occurs.
- Transfer the aqueous upper layer to a new 2 ml tube containing 500 µl of chloroform, shake.
- Centrifuge for 5 min at about 12000 g.
- Transfer upper layer to a new 2 ml tube.
- Add 2 volumes of CTAB precipitation solution, mix by pipetting.
- Incubate for 60 min at room temperature.
- Centrifuge for 5 min at about 13000 rpm and discard the supernatant.
- Dissolve precipitate in 350 µl of NaCl (1.2 M).
- Add 350 µl of chloroform and shake for 30 sec.
- Centrifuge for 10 min at 12000 g until phase separation occurs.
- Transfer upper layer to a new 1.5 ml tube.
- Add 0.6 volume of isopropanol, shake, mix smoothly by inversion, and incubate 20 min at room temperature.
- Centrifuge for 10 min at 12000 g, discard the supernatant.
- Add 500 µl of 70 % of ethanol solution and shake carefully.

- Centrifuge for 10 min at 12000 g, and discard supernatant. Drain the supernatant carefully. DNA pellets may detach from the bottom of the tube at this stage.
- Dry pellets and re-dissolve DNA in 100 µl of sterile TE buffer. The DNA solution may be stored in a refrigerator for a maximum of two weeks, or in the freezer at -20°C for longer periods.

2.4.2. Spectrophotometric Analysis

The ratio between the reading at 260 and 280 nm (i.e. OD260/OD280) provides an estimate of purity of the nucleic acid and the absence of protein contamination. In fact, the maximum absorbance of nucleic acid is at 260 nm while the maximum absorbance of proteins is at 280 nm. Pure preparations of DNA and RNA have OD260/OD280 values of 1.8 and 2.0, respectively. For quantifying the amount of DNA/RNA, reading should be taken at wavelengths of 260 nm. An OD of 1 corresponds to approximately 50 µg/ml for double-stranded DNA and 40 µg/ml for single-stranded DNA and RNA (Sambrook *et al.,* 1989).

Procedure

Add 20 µl of DNA sample to 1980 µl of TE buffer mix thoroughly and read the absorption (OD) in a spectrophotometer at 260 nm and 280 nm.

Calculate the concentration of DNA in the solution according to the following formula:

DNA conc. (µg/ml) = [OD260 x 100 x 50 µg/ml]

2.4.3. Agarose Gel Electrophoresis

Introduction

Agarose gel electrophoresis is a simple and highly effective method for separating DNA fragments of various sizes. The degree of DNA degradation can be estimated by electrophoresis of an aliquot of sample in a mini agarose gel. Large molecular weight DNA appears as a band, perhaps with sharp spikes, whereas partially degraded material forms a long smear of long to small fragments. The percentage of agarose in the gel depends on the size of DNA molecules to be separated (Table 2).

Table 2. Effective range of resolution of linear Agarose (%)

% of agarose	Effective range of separation of DNA molecules (kb)
0.3	30 to 1
0.6	12 to 0.8
0.7	10 to 0.5
0.9	7 to 0.4
1.2	3 to 0.2
1.5	7 to 0.4
2	3 to 0.2

Solutions

1X TBE buffer	90 mM	Tris-acetate
	2 mM	EDTA, pH 8.0
Loading buffer (10X)	0.25%	Bromophenol blue
	50%	Glycerol
	60 mM	EDTA, pH 8.0

Procedure

Preparation of mini agarose gel

- Prepare the gel tray.
- Prepare a 0.7% agarose gel by adding 0.42 g of agarose to 60 ml of 1X TBE buffer.
- Briefly, boil it and cool to 60°C.
- Gently, pour the gel into the tray and remove air bubbles.
- After the gel is completely set, gently remove the comb and place the gel with the tray into the electrophoresis tank.
- Pour approximately 500 ml of 1X TBE buffer into the electrophoresis tank, enough to cover the gel to a depth of about 4 mm.

Loading the gel with DNA samples

- Add the appropriate volume of loading buffer to the DNA samples. Mix by gentle tapping and spin 2-3 sec in a microcentrifuge. (The loading buffer helps in two main ways: 1. It increases the density of the DNA samples ensuring that the DNA samples are loaded evenly into the wells. 2. It allows visualization of the samples facilitating the loading process and the tracking of them migration.
- Carefully, load the DNA samples, avoiding spill-over to adjacent wells. Be sure to include a lane with DNA size marker.
- Put the lid on the gel apparatus; attach the electrodes, making sure that the negative terminal is at the same end of the apparatus as the wells. Apply voltage of 5-10 V/cm. Switch off the power supply when sufficient migration occurs.

Staining and viewing

- Remove the gel from the gel apparatus and immerse in ethidium bromide stain of final concentration of 0.5 µg/ml) for 30 min. Shake gently.

  CAUTION 1: Ethidium bromide is a potential carcinogen; it must never be handled without gloves and should be inactivated before its discard
- View the gel on an UV transilluminator and photograph the gel using a Polaroid camera.

  CAUTION 2: UV light is damaging to eyes and exposed skin. Protective eyewear should be worn at all times when using a UV light source.

2.4.4. Screening of transgenic maize and soybean by Conventional PCR

2.4.4.1. General PCR conditions

Each PCR reaction mix contains template DNA and the other necessary reagents mixed together according to the general instructions given in table (3). PCR is carried out using a PCR Thermocycler System. A general cycling program is depicted in table (4).

Table 3. General PCR master mix

Reagent	Final concentration
10x PCR buffer	1X
25 mM MgCl2	1.5 – 2.5 mM
2 mM dNTPs	0.2 mM
10 µmol primer (F)	0.1 - 1µM
10 µmol primer (R)	0.1 - 1µM
Taq DNA polymerase 5 unit/µL	2 - 2.5 U
Total	**100 µl**

Source: PCR Primer: "A Laboratory manual" 1995

Table 4. General PCR cycling program

	Temperature/ °C	Time /min
Initial denaturation	~ 94	~ 5
Denaturation	~ 94	~ 1
Annealing temperature	*	~ 1
Extension	72	~ 1
Number of cycles (35-50)		
Final extension	72	~ 5
	4	∞

* Differs according to the primers used in table (5).

2.4.4.2. Analysis of PCR products

Agarose Gel Electrophoresis

PCR products can be assessed by running an agarose gel electrophoresis. The percentage of the agarose gel is chosen according to the amplicon size; refer to table (2).

2.4.4.3. Experimental

2.4.4.3.1. Introduction

The following protocols are PCR-based methods allowing the screening of GMOs (using the 35S promoter and the nos terminator) in raw and processed material, by comparison with corresponding non-GM samples (soybean and maize). The following methods allow only a qualitative result with indication of presence/absence of the target sequence in the sample.

2.4.4.3.2. Equipment

- Micropipettes
- Thermocycler
- Microcentrifuge
- Vortex mixer
- Rack for reaction tubes
- 0.2 ml PCR reaction tubes
- 1.5 ml microcentrifuge tubes
- Separate sterile room with a UV hood

REMARK

All equipment should be DNA-free and where possible, sterilised prior to use. In order to avoid contamination, barrier pipette tips protected against possible aerosol formation should be used.

2.4.4.3.3. Reagents

- dNTPs
- 10x PCR buffer (usually delivered from the same supplier as the Taq DNA polymerase)

- 25 mM MgCl2
- Taq DNA polymerase (5 U/µl)
- Upstream and downstream oligonucleotides
- Mineral oil (needed in case a thermocycler without hot lid is used)
- Nuclease-free water

4 mM dNTPs stock solution

dNTPs might be supplied in pre-mixed stocks - containing dATP, dCTP, dGTP, dTTP in equal concentration or separated in individual concentrated stocks.

- If individual stocks are used, dissolve each dNTP in sterile deionised water, to have a final 4 mM dNTP stock solution.
- Divide in aliquots and store at -20°C. dNTPs are stable for several months.

20 µM primer solution

Primer oligonucleotides are generally supplied in lyophilised form and should be diluted
to a final concentration of 20 µM.

- Prepare 20 µM primer solution according to the supplier's instructions.
    - 1 µM = 1 pmol/ µl so 20 µM = 20 pmol/µl
    - X nmol primer + 10X µl sterile water = 100 pmol/ µl = 100 µM
    - Incubate 5 min at 65°C, shake and incubate for another 3 min at 65°C
    - Dilution 1:5 -*Prepare 1 microcentrifuge tube with 400 µl sterile water and add 100 µl of the primer solution (100 µM) -*Final concentration: 20 µM
- Divide into small aliquots and store at -20°C. The aliquots, stored at -20°C, are stable for at least 6 months; the lyophilised primers are stable at - 20°C for up to three years.

10x PCR buffer

Usually the 10x PCR buffer, containing 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25°C) and 1% Triton X-100 is provided together with the Taq DNA polymerase and is ready to use.

- Mix and centrifuge the buffer before each use.
- Divide into aliquots and stored them at -20°C; aliquots stable for several months.

25 mM $MgCl_2$ solution

"PCR grade" $MgCl_2$ solution is generally supplied together with the Taq DNA polymerase and is ready to use.

- Mix and briefly centrifuge the solution before each use (destruction of the concentration gradient which can be formed in the case of a prolonged storage).
- Store at -20°C.

Nuclease-free water aliquots

Sterile nuclease-free, deionised water aliquots are prepared for the Mastermix and for the dilution of the DNA. For each series of analyses, a new aliquot should be used.

2.4.4.3.4. Primers

Primers used in this course are listed in table (5). All primers obtained in a lyophilized state. All primers were dissolved in deionized distilled water before use to obtain a final concentration of 20 µM.

Table (5). Oligonucleotides primer pairs sequence used and their target element

Primer	Sequences	Target gene	Amplicon size(bp)	Annealing temperature *
GMO3 GMO4	GCCCTCTACTCCACCCCCATCC GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG	Lectin gene	118	63
ZEIN3 ZEIN4	AGTGCGACCCATATTCCAG GACATTGTGGCATCATCATTT	Zein gene	277	60
P35s-cf3 P35s-cf4	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	35S promoter	123	62
HA-nos118F HA-nos118R	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG GACACCGCGCGCGATAATTTATCC	Nos terminator	118	62
GMO5 GMO9	CCACTGACGTAAGGGATGACG CATGAAGGACCGGTGGGAGAT	EPSPS gene	447	60
GMO7 GMO8	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA TGGGGTTTATGGAAATTGGAA	EPSPS gene	169	60

.

2.4.4.3.5. Controls

It is important to perform control experiments with every PCR analysis. Negative control in which water is used instead of DNA is designed to check if the PCR reagents are contaminated with DNA. Negative target control which does not contain the target DNA is used to monitor any false results.

Positive target control iscritical in determining the efficiency and specificity of PCR, such as CRMs and plasmids.

Table (6). Plasmids used in the training and their respective constructs

The plasmid	plasmid construct
PGIIMH35-2PS	*35 S pro+ tnos+ bar gene+ g2PS1* gene
TOP10 PGII35S CRYA(b)	*npt* II + *bar* gene + *cry*A(b)
TOP10 PGII35S CRYA(c)	*npt* II + *bar* gene + *cry*A (c)
pBI-121	*npt* II + *gus*A gene
pBI-221	35S *pro+ gus*A gene+ *tnos*

2.4.4.3.6. Soybean specific PCR: Lectin gene

The identification of soybean DNA is performed targeting the lectin gene. The PCR with the primers GMO3/GMO4 determines if amplifiable soybean DNA is present in the sample.

Characteristics of primers GMO3 and GMO4

GMO3	
Sequence	GCCCTCTACTCCACCCCCATCC
Length (bp)	22
Mol.Weight (g/mol)	6471.6
Melting point * (G/C)	65.1
GMO4	
Sequence	GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG
Length (bp)	23
Mol.Weight (g/mol)	6981.1
Melting point * (G/C)	59.6

*based on a [Na] of 50 mM

Controls

It is important to perform control experiments with every PCR analysis. Negative controls are designed to check if the PCR reagents are contaminated with DNA. Positive controls with characterised samples are also critical in determining the efficiency and specificity of PCR. The following controls must be introduced in analysis performed with PCR:

- **Positive control**: pure DNA, isolated from the conventional soybean
- **Negative control**: pure DNA, isolated from another species, not containing the lectin gene
- **No-template control**: negative control of the Mastermix, in which water is used instead of DNA

Mastermix preparation

The necessary reagents for a series of 10 samples (including positive/negative/no template controls) are mixed together according to the instruction given in table (7). The following procedure applies to a sample containing 48 µl of GMO3/GMO4 Mastermix and 2 µl of DNA solution. All solutions are stored on ice during the preparation of the Mastermix.

Table 7. GMO3 / GMO4 Mastermix

	Final concentration	**Mastermix for one sample**	**Mastermix for 10 samples**
Sterile, deionised water	lx	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer GMO3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer GMO4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube
- Add the reagents following the order given in table (7).
- Mix gently the GM03/GM04 Mastermix by pipetting and centrifuge briefly
- Divide the Mastermix into aliquots of 48 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes
- Add 2 µl of the DNA solution to the previous aliquots
- Shake gently and centrifuge briefly
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler
- Run the PCR reaction tubes in the thermocycler according to table (8).

Table 8. PCR program (GMO3/GMO4)

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	63°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Number of cycles (40)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

Following amplification, the samples are centrifuged briefly and put on ice.

Analysis of PCR products

After amplification of the target sequence, the PCR products are analysed by agarose gel electrophoresis in the presence of ethidium bromide. 8 µl of a PCR reaction is mixed with 2 µl loading buffer; samples are then loaded onto the agarose gel (1.5%). Migration is performed at 100 V over a period of 1 hour. Size markers (15 µl of 100 bp ladder) are electrophoresed in adjacent wells of the gel to allow accurate size determination of the amplicons. After the run, ultraviolet transillumination allows visualisation of the DNA in the gel. The gel may be photographed to provide a permanent record of the result of the experiment.

Interpretation of the results

The primer pair GMO3/GMO4 for the detection of the native lectin gene is used as a system control check; a lectin specific band at 118 bp confirms if the extracted DNA is of appropriate amplifiable quality. The positive control will amplify a band at 118 bp. The negative control and the no-template should not give a visible band. If the positive/negative controls do not give the expected results, the PCR analysis of the selected samples is not valid. If the controls give the expected results and the sample does not have a band at 118 bp it means that in this sample no amplifiable soybean DNA is present. It should be noted that this as well as other protocols in this session are qualitative methods, therefore allowing only a qualitative (yes/no) result.

2.4.4.3.7. Maize specific PCR: Zein gene

The identification of maize DNA is performed targeting the zein gene. The PCR with the primers ZEIN3/ZEIN4 determines if maize DNA of suitable amplification quality is present in the sample.

Characteristics of primers ZEIN3 and ZEIN4

ZEIN3	
Sequence	AGTGCGACCCATATTCCAG
Length (bp)	19
Mol.Weight (g/mol)	5772.3
Melting point * (G/C)	55.2
ZEIN4	
Sequence	GACATTGTGGCATCATCATTT
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6410.9
Melting point * (G/C)	51.7

*based on a [Na] of 50 mM

Controls

- **Positive control:** pure DNA, isolated from the conventional maize.
- **Negative control:** pure DNA, isolated from another species, not containing the zein gene.
- **No-template control:** negative control of the Mastermix, in which water is used instead of DNA.

Mastermix preparation

The necessary reagents for a series of 10 samples (including positives/negative/no template controls) are mixed together according to the instructions given in table (9).

The following procedure applies to a sample containing 48 µl of ZEIN3/ZEIN4 Mastermix and 2 µl of DNA solution. All solutions are stored on ice during the preparation of the Mastermix.

Table 9. ZEIN3/ZEIN4 Mastermix

	Final concentration	**Mastermix for one sample**	**Mastermix for 10 samples**
Sterile, deionised water	1x	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer ZEIN3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer ZEIN4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add the reagents following the order given in table (9).
- Mix gently the ZEIN3/ZEIN4 Mastermix by pipetting and centrifuge briefly.
- Divide the Mastermix into aliquots of 48 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes.
- Add 2 µl of the DNA solution to the previous aliquots.
- Shake gently and centrifuge briefly.
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler.
- Run the PCR reaction in the thermocycler according to table (10).

Table 10. PCR program* (ZEIN3/ZEIN4)

	Temperature	**Time**
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	96°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Number of cycles (40)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

Following amplification, the samples are centrifuged briefly and put on ice.

Analysis of PCR products

After amplification of the DNA, the PCR products are analysed using agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. 8 µl of the solution is mixed with 2 µl of loading buffer. The solution mixture is then loaded onto an agarose gel (1.5%). Migration should take place at 100 V over a period of 1 hour. Size markers (15 µl of 100 bp ladder) are electrophoresed in adjacent wells of the gel to allow accurate size determination of the amplicons. After the run, ultraviolet transillumination allows visualisation of the DNA in the gel. The gel may be photographed to provide a permanent record of the result of the experiment.

Interpretation of the results

The primer pair ZEIN3/ ZEIN4 is used for detection of the native maize zein gene as a control check on the amplification quality of the extracted DNA. If the extracted DNA is of sufficient amplification quality a zein specific band of 277 bp will be observed on the gel.

- The positive control should also amplify showing a band size of 277 bp.
- The negative control and the no-template should not give a visible band.
- If the positive/negative controls do not give the expected results, the PCR analysis of the selected samples is not valid.
- If the controls give the expected results and the sample does not have a band at 277 bp, it means that in this sample no amplifiable maize DNA is present.

2.4.4.3.8. Screening of 35S promoter and nos terminator

Genes are under the regulation of promoters and terminators. The most widely used sequences for the regulation of a transgene are the 35S promoter (derived from the CaMV) and the nos terminator (derived from Agrobacterium tumefaciens). The identification of one of these regulatory sequences in the soybean and/or maize containing sample under examination indicates GMO presence.

In Roundup Ready® soybean, the identification of both the 35S promoter and the nos terminator is possible, whereas only the 35S promoter is present in the Bt-176 and MON810 maize lines.

2.4.4.3.8.1. 35S PCR

Characteristics of primers p35S-cf3 and p35S-cr4

p35S-cf3	
Sequence	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6414.5
Melting point * (G/C)	57.4
p355-cr4	
Sequence	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7544.2
Melting point * (G/C)	56.3

*based on a [Na] of 50 mM

Controls

- **Positive control**: DNA from reference material (maize 0.5% GM)
- **Negative control**: DNA from reference material (maize 0% GM)
- **No-template**: negative control of the Mastermix, in which water is used instead of DNA

Mastermix preparation

The necessary reagents for a series of 10 samples (including positive / negative/ no template controls) are mixed together according to the instructions given in table (11).

The following procedure applies to a sample containing 48 µl of p35S-cf3/p35S-cr4 Mastermix and 2 µl of DNA solution. All solutions are stored on ice during the preparation of the Mastermix.

Table 11. p35S-cf3/p35S-cr4 Mastermix

	Final concentration	**Mastermix for one sample**	**Mastermix for 10 samples**
Sterile, deionised water	1x	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM MgCl2	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer p35S-cf	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer p35S-cr4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add the reagents following the order given in table (11).
- Mix gently the p355-cf3/p35S-cr4 Mastermix by pipetting and centrifuge briefly.
- Divide the Mastermix into aliquots of 48 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes.
- Add 2 µl of the DNA solution to the previous aliquots.
- Shake gently and centrifuge briefly.
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler.
- Run the PCR reaction in the thermocycler according to table (12).

Table 12. PCR program (p35S-cf3/p35S-cr4)

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	25 sec
Annealing	62°C	30 sec
Extension	72°C	45 sec
Number of cycles (50)		
Final extension	72°C	7 min
	4°C	∞

Analysis of PCR products

Following amplification, the PCR products are analysed by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. 8 µl of the solution is mixed with 2 µl of loading buffer; the solution is then loaded onto the agarose gel (2.5%). Migration should take place at 100 V over a period of 1 hour. Size markers (15 µl of 100 bp ladder) are electrophoresed in adjacent wells of the gel to allow accurate size determination of the amplicons. After the run, ultraviolet transillumination allows visualisation of the DNA in the gel. The gel may be photographed to provide a permanent record of the result of the experiment.

Interpretation of the results

The primer pair p355-cf3/p35S-cr4 is used for detection of the CaMV 35S promoter, yielding a 123 bp fragment. This promoter regulates the gene expression of many transgenic plants such as Roundup Ready® soybean and maize line Bt-176.

The positive control will amplify showing a band at 123 bp. The negative control and the no- template should not give a visible band. If the positive/negative controls do not give the expected results, the PCR analysis of the selected samples is not valid.

If the controls give the expected results and the sample gives a band at 123 bp, it means that in this sample modified DNA is present.

2.4.4.3.8.2. nos PCR

Characteristics of primers HA-nos 118-f and HA-nos 118-r

HA-nos 118-f	
Sequence	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG
Length (bp)	24
Mol.Weight (g/mol)	7462.8
Melting point * (G/C)	56.2
HA-nos 118-r	
Sequence	GACACCGCGCGCGATAATTTATCC
Length (bp)	24
Mol.Weight (g/mol)	7296.9
Melting point * (G/C)	61.2

*based on a [Na] of 50 mM

Controls

- **Positive control:** DNA from reference material (RRS 0.5% GM)
- **Negative control:** DNA from reference material (soybean 0% GM)
- **No-template:** negative control of the Mastermix, in which water is used instead of DNA

Mastermix preparation

The necessary reagents for a series of 10 samples (including positive/negative/no template controls) are mixed together according to the instructions given in table (13).

The following procedure applies to a sample containing 48 µl of HA-nos118-f/HA-nos118-r Mastermix and 2 µl of DNA solution. All solutions are stored on ice during the preparation of the Mastermix.

Table 13. HA-nos118-f/HA-nos118-r Mastermix

	Final concentration	Mastermix for one sample	Mastermix for 10 samples
Sterile, deionised water	lx	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer p35S-cr4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add the reagents following the order given in table (13).
- Mix gently the HA-nos118-f/HA-nos118-r Mastermix by pipetting and centrifuge briefly.
- Divide the Mastermix into aliquots of 48 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes.
- Add 2 µl of the DNA solution to the previous aliquots.
- Shake gently and centrifuge briefly.
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler.
- Run the PCR reaction tubes in the thermocycler according to table (14).

Table 14. PCR Program (HA-nos118-f/HA-nos118-r)

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	25 sec
Annealing	62°C	30 sec
Extension	72°C	45 sec
Number of cycles (50)		
Final extension	72°C	7 min
	4°C	∞

Following amplification, the samples are centrifuged briefly and put on ice.

Analysis of PCR products

Following amplification, the PCR products are analysed using agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. 8 µl of the solution is mixed with 2 µl of loading buffer; the solution is then loaded onto an agarose gel (2.5%). Migration should take place at 100 V over a period of 1 hour. Size markers (15 µl of 100 bp ladder) are electrophoresed in adjacent wells of the gel to allow accurate size determination of the amplicons. After the run, ultraviolet transillumination allows visualisation of the DNA in the gel. The gel may be photographed to provide a permanent record of the result of the experiment.

Interpretation of the results

The primer pair HA-nos118-f/HA-nos118-r is used for detection of the nos terminator, yielding a 118 bp fragment. This terminator is present in the Roundup Ready® soybean and other lines of transgenic plants (e.g. Maize line Bt-11).

The positive control will amplify showing a band at 118 bp.

The negative control and the no-template should not give a visible band.

If the positive/negative controls do not give the expected results, the PCR analysis of the selected samples is not valid.

If the controls give the expected results and the sample gives a band at 118 bp, this means that in this sample modified DNA is present.

2.4.5. Identification of MON810 maize and Roundup Ready® soybean by nested PCR

2.4.5.1. Detection of MON810 maize

The detection system is specific for MON810 maize. Target elements are the CaMV 35S promoter and the hsp70 exonl/intronl region, which are a constitutive regulatory sequence and heat shock protein gene for an increased level of transcription, respectively.

Characteristics of primers mg1, mg2, mg3 and mg4

mg 1	
Sequence	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7665.1
Melting point * (G/C)	59.6
mg 2	
Sequence	TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7560.2
Melting point * (G/C)	57.9
mg 3	
Sequence	ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7472.2
Melting point * (G/C)	61.2
mg 4	
Sequence	GCATTCAGAGAAACGTGGCAGTAAC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7722.9
Melting point * (G/C)	59.6

*based on a [Na] of 50 mM

Controls

- **Positive control:** DNA from reference material (MON810 0.1%)
- **Negative control:** DNA from reference material (maize 0% GM)

- **No-template:** negative control of the Mastermix, in which water is used instead of DNA

Mastermix preparation 1

The necessary reagents for a series of 10 samples (including positive/negative/no template controls) are mixed together according to the instructions given in table (15).

The following procedure applies to a sample containing 48 µl of mg1/mg2 Mastermix and 2 µl of DNA solution. All solutions are stored in ice during the preparation of the Mastermix.

Table 15. Mastermix for (mg1 / mg 2)

	Final concentration	Mastermix for one sample	Mastermix for 10 samples
Sterile, deionised water		32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonucleotide mg1	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonucleotide mg2	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		48 µl	480 µl

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add the reagents following the order given in table (15).
- Mix gently the mg1/mg2 Mastermix by pipetting and centrifuge briefly.
- Divide the Mastermix into aliquots of 48 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes.
- Add 2 µl of the DNA solution to the previous aliquots.
- Shake gently and centrifuge briefly.
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler.
- Run the PCR reaction tubes in the thermocycler according to table (16).

Table 16. PCR program (mg1/mg2)

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	45 sec
Annealing	60°C	50 sec
Extension	72°C	50 sec
Number of cycles (35)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

Following amplification, the samples are centrifuged briefly and put on ice.

Mastermix preparation 2

The necessary reagents for a series of 10 samples are mixed together according to the instructions given in table (17). The following procedure applies to a sample containing 49 µl of mg3/mg4 Mastermix and 1 µl of pre-amplified DNA solution of the first PCR. All solutions are stored on ice during the preparation of the Mastermix.

Table 17. mg3/mg4 Mastermix

	Final concentration	Mastermix for one sample	Mastermix for 10 samples
Sterile, deionised water		33.75 µl	337.5 µl
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonucleotide mg3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonucleotide mg4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		**49 µl**	**490 µl**

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add the reagents following the order given in table (17).
- Mix gently the mg3/mg4 Mastermix by pipetting and centrifuge briefly
- Divide the Mastermix into aliquots of 49 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes.
- Add 1 µl of the DNA solution to the previous aliquots.
- Shake gently and centrifuge briefly.
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler.
- Run the PCR reaction tubes in the thermocycler according to table (18).

Table 18. Program for the nested PCR (mg3-mg4)

	Temperature	**Time**
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	45 sec
Annealing	60°C	50 sec
Extension	72°C	50 sec
Number of cycles	40	
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

Following amplification, the samples are centrifuged briefly and put on ice.

Analysis of PCR products

Following amplification, the PCR products are analysed using agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. 8 µl of the solution is mixed with 2 µl of loading buffer; the solution is then loaded onto an agarose gel (2.5%). Migration should take place at 100 V over a period of 1 hour. Size markers (15 µl of 100 bp ladder) are run in adjacent wells of the gel to allow accurate size determination of the amplicons. After the run, ultraviolet transillumination allows visualisation of the DNA in the gel. The gel may be photographed to provide a permanent record of the result of the experiment.

Interpretation of the results

The primer pairs mg1/mg2 and mg3/mg4 were designed for the specific detection of the MON810 event by nested PCR, yielding a final nested PCR fragment of 149 bp. The specificity is given by the fact that primers are designed on the region spanning the E-355 promoter and the hsp70 exon/intron gene. The positive control will amplify showing a band at 149 bp. The negative control and the no-template should not give a visible band. If the positive/negative controls do not give the expected results, the PCR analysis of the selected samples is not valid. If the controls give the expected results and the sample gives a band at 149 bp, this means that in this sample MON810 maize DNA is present.

2.4.5.2. Detection of Roundup Ready® soybean

The target is the CP4 EPSPS gene, which confers resistance to the herbicide Roundup®.

Characteristics of primers GMO5, GMO9, GMO7 and GMO8

GMO5	
Sequence	CCACTGACGTAAGGGATGACG
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6479.4
Melting point * (G/C)	59.5
GMO9	
Sequence	CATGAAGGACCGGTGGGAGAT
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6559.4
Melting point * (G/C)	59.5
GMO7	
Sequence	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6309.6
Melting point * (G/C)	55.8
GMO8	
Sequence	TGGGGTTTATGGAAATTGGAA
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6579.8
Melting point * (G/C)	51.7

*based on a [Na] of 50 mM

Controls

- **Positive control:** DNA from reference material (RRS 0.1% GM)
- **Negative control:** DNA from reference material (soybean 0% GM)
- **No-template:** negative control of the Mastermix, in which water is used instead of DNA

Mastermix preparation 1

The necessary reagents for a series of 10 samples (including positive/negative/no template controls) are mixed together according to the instructions given in table (19).

The following procedure applies to a sample containing 48 µl of GMO5/GMO9 Mastermix and 2 µl of DNA solution. All solutions are stored on ice during the preparation of the Mastermix.

Table 19. GMO5/GMO9 Mastermix

	Final concentration	Mastermix for one sample	Mastermix for 10 samples
Sterile, deionised water		32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonucleotide GMO5	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonucleotide GMO9	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		**48 µl**	**480 µl**

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add the reagents following the order given in table (19).
- Mix gently the GMO5/GMO9 Mastermix by pipetting and centrifuge briefly.
- Divide the Mastermix into aliquots of 48 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes.
- Add 2 µl of the DNA solution to the previous aliquots.
- Shake gently and centrifuge briefly.
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler.
- Run the PCR reaction tubes in the thermocycler according to table (20).

Table 20. PCR program (GMO5/GMO9)

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	60°C	30 sec
Extension	72°C	40 sec
Number of cycles (25)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

Following amplification, the samples are centrifuged briefly and put on ice.

Mastermix preparation 2

The necessary reagents for a series of 10 samples are mixed together according to the instructions given in table (21). The following procedure applies to a sample containing 49 µl of GMO7/GMO8 Mastermix and 1 µl of pre-amplified DNA solution of the first PCR. All solutions are stored on ice during the preparation of the Mastermix.

Table 21. GMO7/GMO8 Mastermix

	Final concentration	Mastermix for one sample	Mastermix for 10 samples
Sterile, deionised water		33.75 µl	337.5 µl
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonucleotide GMO7	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonucleotide GMO8	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		**49 µl**	**490 µl**

- Prepare a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add the reagents following the order given in table (21).
- Mix gently the GM07/GM08 Mastermix by pipetting and centrifuge briefly.
- Divide the Mastermix into aliquots of 49 µl in 0.2 ml PCR reaction tubes.
- Add 1 µl of the DNA solution to the previous aliquots.
- Shake gently and centrifuge briefly.
- Place the PCR reaction tubes in the thermocycler.
- Run the PCR reaction tubes in the thermocycler according to table (22).

Table 22. Program for the nested PCR (GMO7/GMO8)

	Temperature	**Time**
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	60°C	30 sec
Extension	72°C	40 sec
Number of cycles (35)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

Following amplification, the samples are centrifuged briefly and put on ice.

Analysis of PCR products

Following amplification, the PCR products are analysed by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. 8 µl of the solution is mixed with 2 µl of loading buffer; the solution is then loaded onto an agarose gel (2.5%). Migration should take place at 100 V over a period of 1 hour. Size markers (15 µl of 100 bp ladder) are electrophoresed in adjacent wells of the gel to allow accurate size determination of the amplicons. After the run, ultraviolet transillumination allows visualisation of the DNA in the gel. The gel may be photographed to provide a permanent record of the result of the experiment.

Interpretation of the results

The primer pairs GM05/GM09 and GM07/GM08 were designed for the specific detection of the gene construct of Roundup Ready® soybean by nested PCR, yielding a nested PCR fragment of 169 bp. The primers GMO5 and GMO7 are complementary to the CaMV 35S promoter, GMO9 hybridises with the CP4 EPSPS gene of Agrobacterium sp. strain CP4 and GMO8 with the CTP EPSPS gene. The positive control will amplify showing a band at 169 bp.

The negative control and the no-template should not give a visible band. If the positive/negative controls do not give the expected results, the PCR analysis of the selected samples is not valid.

If the controls give the expected results and the sample gives a band at 169 bp, it means that in this sample Roundup Ready® soybean DNA is present.

2.4.6. Quantification of Roundup Ready® Soybean by Multiplex Real-time PCR

Introduction

The following protocol is a real-time PCR-based method for the quantification of a specific GM soybean line (Roundup Ready® soybean) in raw and processed material. The real-time PCR quantification is carried out with a PCR thermocycler "ABI PRISM® 7500 SDS (Applied Biosystems)" which is equipped to detect amplification in real-time by measuring fluorescence. Real-time PCR is used to amplify an endogenous reference target DNA sequence (that is unique to soybean), plus a DNA target sequence that indicates the presence of genetically modified soybean (Roundup Ready® soybean). The assay encompasses two independent PCR systems, each with specific DNA primers and dye-labelled probes. One PCR system detects a GMO-specific target DNA sequence, the other is an endogenous reference system designed to serve as a quantitative reference that detects GM and non-GM soybean.

Note: The protocol included in this manual has been chosen for didactical purposes and should be considered as a basal example of GMO quantification using the real-time PCR approach. We recommend to periodically reviewing pertinent sources and literature to acquire information on more recently developed and validated protocols. Please also note that these protocols have been selected according to the instrumentation available in our laboratory. The JRC and the WHO in no way promote the exclusive use of any particular company or brand.

Real-time PCR using the ABI PRISM® 7500

This method consists of an amplification/quantification of the lectin reference gene and a part of the RR soybean inserted cassette using a multiplex PCR assay (two PCR reactions in the same tube) (Onori et al., submitted). The TaqMan lectin and RR probes are labelled with the VIC dye and the FAM dye, respectively, making it possible to detect amplification of more than one target in the same tube. The reporter dye (FAM) is distinguishable from the VIC as a consequence of their different maximal emission wavelengths. The ABI PRISM® 7700 SDS is able to detect multiple dyes with distinct emission wavelengths.

The amount of RR-soybean (FAM) dye is normalised to the amount of plant material (VIC) dye detected in each sample. This produces a ΔCT value, which is averaged for replicate samples. These values are compared to a calibration curve produced from the ΔCT of the known RR-soybean concentration standards (Comparative CT method, or ΔΔCT).

This procedure was successfully applied to various raw materials, ingredients and foods containing soybean (e.g. feed, soy drink, yoghurt, flour, lecithin etc.).

The analytical performance of the method has been successfully monitored during several proficiency-testing schemes (e.g. FAPAS®, GIPSA).

Equipment and Reagents

- ABI ® 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems)
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates (Cat No. N801-0560)
- MicroAmp Optical caps (Cat No. N801-0935)
- TaqMan® Universal PCR Mastermix (Cat No. 4304437) 2X containing: TaqMan Buffer 2x AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5U/g1), AmpErase® UNG (1U/m1), dNTPs 200 µM with dUTP, Passive Reference 1

- Microcentrifuge
- Refrigerated centrifuge for 15 ml conical tubes
- Micropipettes
- Vortex mixer
- Rack for reaction tubes
- 1.5 ml microcentrifuge tubes
- 15 ml polypropylene conical centrifuge tubes
- Nuclease-free water
- Reference gene specific primers (Le-F and Le-R) and probe (Le-Probe)
- Transgene specific primers (RR-F and RR-R) and probe (RR-Probe)

Primers and probes

Characteristics of primers and probe for the reference gene

Le-F	
Sequence	TCC ACC CCC ATC CAC ATT T
Length (bp)	19
Mol. weight	5586.0

Le-R	
Sequence	GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA
Length (bp)	24
Mol. Weight	7532

Le-Probe	
Sequence	5'-(VIC)-AAC CGG TAG CGT TGC CAGCTTCG-(TAM RA)-3'
Length (bp)	23
Mol. weight	7019.0

Characteristics of primers and probe for the transgene

RR-F	
Sequence	GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT
Length (bp)	23
Mol. Weight	7014

RR-R	
Sequence	GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C
Length (bp)	25
Mol. Weight	7712

RR-Probe	
Sequence	5'-(FAM)-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG-(TAMRA)-3'
Length (bp)	33
Mol. Weight	10137

Mastermix preparation

- Thaw, mix gently and centrifuge the required amount of components required for the reaction. Keep thawed reagents on ice.
- In one 15 ml centrifuge tube kept on ice, add the following components in the order as in table (23) to prepare the mastermixes. Each DNA extract is analysed in triplicate. Please Note that four more reaction mixes are prepared to help calculate pipetting errors due to solution viscosity.

Table 23. Preparation of the mastermix for one plate of multiplex PCR assay.

	Concentration in PCR	Mastermix for one reaction vessel (µl)	Mastermix for one sample (3 repititions)	Mastermix for one plate (32+4 samples)
Sterile, deionised water		18.3	54.9	1976.4
TaqMan Universal Mastermix (2x)	lx	25	75	2700
Primer Le-F (20 µM)	40 nM	0.1	0.3	10.8
Primer Le-R (20 µM)	40 nM	0.1	0.3	10.8
Primer RR-F (20 µM)	100 nM	0.25	0.75	27
Primer RR-R (20 µM)	100 nM	0.25	0.75	27
Le-Probe (10 µM)	100 nM	0.5	1.5	54
RR-Probe (10 µM)	100 nM	0.5	1.5	54
DNA	50-250 ng	5	**15**	
TOTAL		50	**150**	

- Mix gently and centrifuge briefly.
- Prepare one 1.5 ml microcentrifuge tube for each DNA sample to be tested: standard curve samples (CRM - RR soybean at 0.1, 0.5, 1, 2, and 5%) unknown samples and control samples (0% RR-soybean, DNA from RR-soybean and No-Template Control).
- Add to each microcentrifuge tube the amount of mastermix needed for 3 repetitions (135 µl mastermix). Add to each tube the required amount of DNA for 3 repetitions (i.e. 15 µl DNA). Vortex each tube at least three times for approx 10 sec. This step is of particular importance as it helps reduce to a minimum the variability between the four replicas of each sample.
- Spin briefly in a microcentrifuge. Place the 96-well reaction plate in a base and aliquot 50 µl in each well horizontally from left to right. After adding mastermixes to one vertical row of wells, cover the wells with optical caps using the cap-installing tool.

  Note: *do not write on the optical plate and do not touch the cap*

- Ensure that the loaded mastermix aliquots are in the bottom of the wells, with no splashes or bubbles on the side or in the caps.
- Place the plate into the ABI PRISM® 7700 instrument; open a new plate setup window to assign the sample type to each well: the IPC sample type is associated with the VIC dye and the UNKN on the FAM dye layer.
- Cycle the samples as described in table (24).

Table 24. Cycling program for the RR-soybean multiplex assay on ABI PRISM® 7700 SDS

Step	Stage		T°C	Time	Acquisition	Cycles
1	U NG		50°C	120 sec	no	lx
2	Initial denaturation		95°C	600 sec	no	lx
3	Amplification	Denaturation	95°C	15 sec	no	45x
4		Annealing & Extension	60°C	60 sec	Measure	

Data analysis and interpretation of results

After the run is completed data are analysed using the ABI PRISM® 7700 SDS software to produce CT values of each reporter dye for each sample. It is important to properly number samples in the SDS software Plate Setup window. Each well should be given a unique number in the "Replicate" field; replicates of the same sample should be given the same number. Analyse the run by selecting "analyse" from the Analysis menu to automatically access the amplification plot window; adjust the threshold value for the FAM and VIC layers. After analysing the run export the results on an excel file Opening the exported results file in Microsoft®Excel, a table containing two sets of data corresponding to the FAM and VIC dye layers appears with CT values for each well. Calculate the CT (FAM) and CT (VIC) average of each group of replicate to calculate the ΔCT values (CT FAM — CT VIC). For each sample, %GMO is calculated by analysing the sample's ΔCT, comparing it to the set of log (% GMO) and ΔCT values obtained from the concentration standards set.

2.4.7. Quantification of maize TC1507 by Uniplex Real-Time PCR

Principle

This method determines the relative content of event TC1507 DNA to total maize DNA in a sample. It amplifies a segment spanning the recombination region of the construct with the plant genome.

For relative quantitation of event TC1507 DNA, a fragment of a maize-specific reference gene "High Mobility Group gene" (HMG) is amplified as well.

PCR products are measured during each cycle (real-time) by means of target-specific fluorescent probes. The measured fluorescence signal passes a threshold value after a certain number of cycles. This threshold cycle is called the "Ct" value. For quantitation of the amount of event TC1507 DNA in a test sample, event TC1507 and HMG Ct values are determined for the sample. Standard curves are then used to calculate the relative content of event TC1507 DNA to total maize DNA.

Materials

Equipment

- Real-time PCR instrument for plastic reaction vessels (glass capillaries are not recommended for the described buffer composition)
- Plastic reaction vessels suitable for real-time PCR instrument (enabling undisturbed fluorescence detection)
- Software for evaluating data after standard curve method (mostly integrated in the software of the real-time PCR instrument)
- Microcentrifuge
- Micropipettes

- Vortex
- Rack for reaction tubes
- 1.5/2.0 ml tubes

Reagents

(Equivalents may be substituted)

- TRIS pH=8.0: Tris[hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride (Molecular Biology grade)
- KOAc (SIGMA Part No P1190)
- Gelatine (VWR Part No 1.04078.1000)
- Tween 20 (SIGMA Part No P9416-50ML)
- Glycerol (SIGMA Part No P5516-100ML)
- Rox (Applied Biosystems Part No 434925)
- dATP (GeneCraft Part No GC-013-007)
- dCTP (GeneCraft Part No GC-013-009)
- dGTP (GeneCraft Part No GC-013-006)
- dUTP (GeneCraft Part No GC-013-010)
- MgCl 2 (SIGMA Part No M1028-1ML)
- Ampli Taq Gold (Applied Biosystems Part No N8080242)

Primers and Probes

	Name	**Oligonucleotide DNA Sequence (5' to 3')**
	TC1507 target sequence	
Primers	MaiY-F1 MaiY-R3	TAG TCT TCG GCC AGA ATG G CTT TGC CAA GAT CAA GCG
Probe	MaiY-S1	6-FAM-TAA CTC AAG GCC CTC ACT CCG-TAMRA
	Reference gene HMG target sequence	
Primers	MaiJ-F2 mhmg-rev	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
Probe	Mhmg-probe	6-FAM-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-TAMRA

Buffers and Solutions

Preparation of the 10x Buffer

Mix the following chemicals at the final concentration indicated and adjust the buffer to pH = 8.0

Component	Final concentration
Tris pH = 8.0	0.5 M
KOAc	0.5 M
Gelatine	0.5%
Tween 20	0.1%
Glycerol	0.8%
Rox	0.2 µl/reaction
Water	-

General

The PCR set-up for the taxon specific target sequence (HMG) and for the GMO (TC1507) target sequence should be carried out in separate vials. Multiplex PCR (using differential fluorescent labels for the probes) has not been tested or validated.

The use of maximum 200 ng of template DNA per reaction well is recommended.

The method is developed for a total volume of 25 µl per reaction mixture with the reagents as listed in table (25) and table (26).

Standard Curve

Separate calibration curves with each primer/probe system are generated in the same analytical amplification run. The calibration curves consist of four dilutions of a DNA sample containing 10% TC1507. A series of one to five dilution intervals at a starting concentration of 73,394 maize genome copies may be used (corresponding to 200 ng of DNA with one maize genome assumed to correlate to 2.725 pg of haploid maize genomic DNA) (Arumuganathan & Earle, 1991).

A calibration curve is produced by plotting Ct-values against the logarithm of the target copy number for the calibration points. This can be done e.g. by use of

spreadsheet software, e.g. Microsoft Excel, or directly by options available with the sequence detection system software.

The copy numbers measured for the unknown sample DNA is obtained by interpolation from the standard curves.

Procedure

- Thaw, mix gently and centrifuge the required amount of components needed for the run. Keep thawed reagents at 1-4°C on ice.
- In two reaction tubes (one for TC1507 system and one for the HMG system) on ice, add the following components in the order mentioned in table (25) and (26) (except DNA) to prepare the master mixes.
- Mix gently and centrifuge briefly.
- Prepare two reaction tubes (one for the TC1507 and one for the HMG master mix) for each DNA sample to be tested (standard curve samples, unknown samples and control samples).
- Add to each reaction tube the correct amount of master mix (e.g. 20 x 3 = 60 µl master mix for three PCR repetitions). Add to each tube the correct amount of DNA (e.g. 5 x 3 = 15 µl DNA for three PCR repetitions). Low-speed vortex each tubes at least three times for approx 30 sec. This step is mandatory to reduce the variability among the repetitions of each sample to a minimum.
- Spin down the tubes in a micro-centrifuge. Aliquot 25 µl in each well. Seal the reaction plate with optical cover or optical caps. Centrifuge the plate at low speed (e.g. approximately 250 x g for 1 minute at 4 °C to room temperature) to spin down the reaction mixture.
- Run the place in the real-time PCR machine according to table (27).

Table 25. Master Mix for TC1507 specific system

Component Final concentration	**µl/reaction**
Buffer 10x (including Rox) 1x	2.5 µl
Primer MaiJ-F1 300 nM	-
Primer mhmg-rev 300 nM	-
Probe mhmg 180 nM	-
MgCl2 25 mM 4.5 mM	4.5 µl
dNTPsa 10/20 mM 200/400 µM	0.5 µl
AmpliTaq Gold Polymerase 1U/reaction	-
Nuclease free water	up to 25 µl
[Template DNA (maximum 200 ng)]	(5 µl)
Total reaction volume:	25 µl

[a] dATP (10 mM), dCTP (10 mM), dGTP (10 mM), dUTP (20 mM)

Table 26. Master Mix for the reference HMG specific system

Component Final concentration	**µl/reaction**
Buffer 10x (including Rox) 1x	2.5 µl
Primer MaiY-F1 300 nM	-
Primer MaiY-R3 300 nM	-
Probe MaiY-S1 150 nM	-
MgCl2 25 mM 5.5 mM	5.5 µl
dNTPsa 10/20 mM 200/400 µM	0.5 µl
AmpliTaq Gold Polymerase 1U/reaction	
Nuclease free water	up to 25 µl
[Template DNA (maximum 200 ng)]	(5 µl)
Total reaction volume:	25 µl

[a] dATP (10 mM), dCTP (10 mM), dGTP (10 mM), dUTP (20 mM)

Table 27. Cycling Conditions

Cycle	Step		Temp. (ºC)	Time (sec)	Data Collection	Repetitions
1	Initial Denaturation		95	600	No	1
2	Amplification	Denaturation	95	15	No	1
		Annealing & Extension	60	60	Yes	45

Data analysis

a. Set the threshold:

- Display the amplification curves of one system (e.g. TC1507) in logarithmic mode.
- Locate the threshold line in the area where the amplification profiles are parallel (exponential phase of PCR) and where there is no "fork effect" between repetitions of the same sample.
- Press the update button to ensure changes affect Ct values.
- Switch to the linear view mode by clicking on the Y axis of the amplification plot, and check that the threshold previously set falls within the geometric phase of the curves.

b. Set the baseline:

- Determine the cycle number at which the threshold line crosses the first amplification curve.
- Set the baseline three cycles before that value (e.g. earliest Ct = 25, set the baseline crossing at Ct = 25 – 3 = 22).

c. Save the settings

d. Repeat the procedure described in a) and b) on the amplification plots of the other system (e.g. HMG system).

e. Save the settings and export all the data into an Excel file for further calculations.

Calculation of results

The standard curves are generated both for the HMG and TC1507 specific systems by plotting the Ct-values measured for the calibration points against the logarithm of the DNA copy numbers, and by fitting a linear regression line into these data. Thereafter, the standard curves are used to estimate the copy numbers in the unknown sample DNA by interpolation from the standard curves.

For the determination of the amount of TC1507 DNA in the unknown sample, the TC1507 copy number is divided by the copy number of the maize reference gene (HMG) and multiplied by 100 to obtain the percentage value (GM% = TC1507/HMG * 100).

Limit of detection

According to the method developer, the absolute LOD of the method is 1.25 copies (8 positives out of 10 replicates).

Limit of quantitation

According to the method developer, the relative LOQ of the method is ≤ 0.08%. The absolute LOQ for the individual systems is ≤ 10 copies (TC1507) and ≤ 40 copies (HMG).

References

1. Aarts H.J., van Rie J.P., Kok E.J. (2002). Traceability of genetically modified organisms. Expert Rev Mol Diagn 2(1), 69–76.
2. Abdul Kader, A.M., Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S., Bauer, W.B. and Beer, S.V. (1999). Evaluation of the hrpN gene for increasing resistance to fire blight in transgenic apple. Acta Horticulturae 489: 247-250.
3. Adrian, S.; Nigel, S. and Mark, F. (2003). Plant Biotechnology. The genetic modification of plants. Oxford University Press Inc., NewYork.
4. Ahmed, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Trends Biotechnol, 20: 215-223.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular biology of the cell, Garland Science, Taylor and Francis Group, NY.
6. Amexis G, Oeth P, Abel K, Ivshina A, PelloquinF, Cantor CR, Brau A, Chumakov K (2001) Quantitative mutant analysis of viral quasispecies by chip-based MALDI–TOF mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 12097–12102.
7. Anklam E, Gadani F, Heinze P (2002) Analytical methods for detection and etermination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. Eur. Food Res. Technol . 214: 3–26.
8. Arvanitoyannis, I.S. (2003). Genetically engineered/modified organisms in foods. Applied Biotechnology, Food Science and Policy 1 (1): 3-12.
9. Auroux PA, Koc Y, deMello A, Manz A, Day PJ. (2004) Miniaturised nucleic acid analysis. Lab Chip. 4, 534–546.
10. Arumuganathan, K., Earle, E.D. (1991). Nuclear content of some important plant species. Plant Mol Biol Reporter 9, 208-218.
11. Auroux PA, Koc Y, deMello A, Manz A, Day PJ. (2004) Miniaturised nucleic acid analysis. Lab Chip. 4, 534–546.
12. Barany F (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermo-stable ligase. Proc Natl Acad Sci USA 88, 189–193.
13. Barnum, S. R. (1998). Biotechnology, An introduction. Wedsorth Publishing Company. Belmont, CA, Newyouk, Paris, Tokyo.pp. pp. 49-68.
14. Birch L, Archard CL, Parkes HC, McDowell DG (2001) Evaluation of Lab. Chip technology for GMO analysis in food. Food Control 12, 535–540.

15. Bjorling S, Kinjo M, Foldes-Papp Z, Hagman E, Thyberg P, Rigler R (1998) Fluorescence correlation spectroscopy of enzymatic DNA polymerization. Biochemistry, 37, 12971–12978.
16. Bonifini Laura, Heinze Petra, Kay Simon, Van den Eede Guy (2002) Review of GMO detection and quantification techniques, European Commission, Directorate General JRC, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, Community Reference Laboratory for GM Food and Feed. EUR 20384/EN.
17. Bordoni R, Germini A, Mezzelani A, Marchelli R, De Bellis G. (2005) A microarray platform for parallel detection of five transgenic events in foods: a combined polymerase chain reaction-ligation detection reaction-universal array method. J Agric Food Chem. 53, 912–918.
18. Brunnert HJ, Spener F, Boerchers T (2001) PCR-ELISA for the CaMV- 35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. Eur. Food Res Technol 213, 366–371.
19. Buhk, H.-J. (2002). Genetically modified food and feed; regulations, recent developments and openquestions. Proc.Soc. Nutr. Physiol., 11, 177-178.
20. Burns MJ, Valdivia H, Harris N. (2004) Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. Anal Bioanal Chem. 378, 1616–1623.
21. Carey L, Mitnik L (2002). Trends in DNA forensic analysis. Electrophoresis 23, 1386–1397.
22. Carpini G, Lucarelli F, Marrazza G, Mascini M. (2004) Oligonucleotide-modified screen printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. Biosens Bioelectron. 20, 167–175.
23. Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AM, Karenlampi S, Kok EJ, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborn HP, Pedersen J, Smith M (2004) Unintended effects and their detection in genetically modified crops. Food Chem Toxicol. 42, 1089–1125.
24. Chapman JR (1998) Mass spectrometry, in: Molecular Biomethods Handbook (Rapley R Walker JM, eds.), Humana Press, Totowa, NJ. Contente S, Dubnau D (1979) Marker rescue transformation by linear plasmid DNA in Bacillus subtilis. Plasmid 2, 555–571.
25. Chowdhury E.H. , H. Kuribara, A. Hino, P. Sultana, O. Mikami, N. Shimada, K. S. Guruge, M. Saito and Y. Nakajima. (2003). Detection of corn intrinsic and recombinant

DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn 2003. Journal of Animal Science 2003. 81:2546-2551.

26. Chawla, H.S. (2002). Introduction to Plant Biotechnology. PP. 225-247. Science Publishers, Inc. USA, UK.
27. Contente S, Dubnau D. (1979). Marker rescue transformation by linear plasmid DNA in Bacillus subtilis. Plasmid. 2(4):555–571. [PubMed]
28. Dahinden I, Zimmermann A, Liniger M, Pauli U (2002) Variation analysis of seven LightCycler-based real-time PCR systems to detect genetically modified products (RRS, Bt176, Bt11, Mon810, T25, Lectin, Inverstase). in: Rapid Cycle Real-time PCR, methods and Applications – Microbiology and Food analysis (Reischl U, Wittwer C, Cockerill, eds. 2002), Springer Berlin.
29. De Vries J, Wackernagel W. (1998). Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. Mol Gen Genet. 257(6):606-13.
30. Drummond TG, Hill MG, Barton JK. (2003) Electrochemical DNA sensors. Nat Biotechnol. 21,1192–1199
31. Einspanier (2001a) Quantifying genetically modified material in food: searching for a reliable certification. Eur. Food Res. Technol 213, 415–416
32. Einspanier R, Klotz A, Kraft J, Aulrich K, Poser R, Schwaegele F, Jahreis G, Flachowsky G (2001b) The fate of forage plant DNA in farm animals: A collaborative casestudy investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. Eur.Food Res. Technol. 211, 129–134.
33. EU Tender Report. (2000). Development of qualitative as well quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize products. Report of the EU tender n.) 0 (IV/98/A3/001.
34. Falciatore, A., Formiggni, F. and Bowler, Ch. (2002). Reporter genes and *in vivo* imaging. Pp. 265-283. In: Gilmartin, P.M. and Bowler, C. (eds.). Molecular Plant Biology. Vol. 2. Oxford University Press.
35. Freeman, W.M., Robertson, D.J., and Vrana, K.E. (2000). Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. BioTechniques 29, 1042-1055.
36. Feriotto G, Borgatti M, Mischiati C, Bianchi N, Gambari R (2002) Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified roundup ready soybean gene sequences. J Agric Food Chem 27, 955–962.

37. Feriotto G, Gardenghi S, Bianchi N, Gambari R. (2003) Quantitation of Bt-176 maize genomic sequences by surface Plasmon resonance-based biospecific interaction analysis of multiplex polymerase chain reaction (PCR). J Agric Food Chem. 51, 4640–4646.
38. Foti, N.; Onori, R.; Donnarumma, E.; Santis, B. de; Miraglia, M.(2006). Real-Time PCR "Multiplex" Method for the Quantification of Roundup Ready soybean in processed food. European Food Research and Technology 222 (1-2) 209–2
39. Garcia-Canas V, Gonzalez R, Cifuentes A.(2004) Sensitive and simultaneous analysis of five transgenic maizes using multiplex polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. Electrophoresis 25, 2219–2226.
40. Germini A, Rossi S, Zanetti A, Corradini R, Fogher C, Marchelli R. (2005). Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food. J Agric Food Chem. 53, 3958–3962.
41. Gilbert (1999) Sampling of raw materials and processed foods for the presence of GMOs. Food Control 10, 363–365.
42. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods 25, 386–401.
43. Grandillo, S. and Fulton, T.M. (2002). Approaches to gene mapping. Pp. 101-136. In: Gilmartin, P.M. and Bowler, C. (eds.). Molecular Plant Biology. Vol. 2. Oxford University Press.
44. Gurinder Jit Randhawa, Monika Singh, Rashmi Chhabra and Ruchi Sharma, Qualitative and Quantitative Molecular Testing Methodologies and Traceability Systems for Commercialised Bt Cotton Events and Other Bt Crops Under Field Trials in India.
45. Gryson N, Ronsse F, Messens K, Loose de M, Verleven T, Dewettinck K (2002) Detection of DNA during the refining of soybean oil. J Am Oil Chem Soc 79, 171–174.
46. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR(1990) Isothermal, in vitro amplficication of nucleic acids by a multi-enzyme reaction modeled after retroviral replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874–1878.
47. Gut IG. (2004) DNA analysis by MALDITOF mass spectrometry. Hum Mutat. 23, 437–444.
48. Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D, Zhang D, Esteve T, Pla M, Prat S. (2005) Inter-laboratory transfer of a PCR multiplex method for simultaneous detection of four

genetically modified maize lines: Bt11, MON810, T25, and GA21. J Agric Food Chem. 53, 3333–3337.

49. Heller KJ (2006) Detection of enetic modifications-some basic considerations. Pp. 157-185. In Heller KJ (ed). Genetically Engineered Food. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
50. Hintsche R, Paeschke M, Uhlig A, Seitz R (1997) Microbiosensors using electrodes made in Si-technology. EXS 80, 267–283.
51. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5–3 exonuclease activity of Thermus aquaticis DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7276–7280.
52. Holst-Jensen, A.-J. (2001). GMO detection methods and validation.
53. www.entrancfood.com/workinggroups/wg4TOA/GMO%20%detection
54. Holst-Jensen A, Ronning SB, Lovseth A, Berdal KG. (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). Anal Bioanal Chem. 375, 985–993.
55. Holst-Jensen A, Berdal KG (2004) The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. J AOAC Int. 87, 927–936.
56. Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P (2001) Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. J AOAC Int 84,1855–1864.
57. Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, Moreano F, Engel KH (2000) PCR-based quantifiation of genetically modified Bt maize: single competitive versus dual competitive approach. Eur. Food Res. Technol. 212, 95–99.
58. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (1990) PCR protocols – a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.
59. ISO 24333(2009). Cereals and cereal products-sampling.
60. Jain KK (2005) Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. Clin. Chim. Acta. 358, 37–54.
61. James, C (2010). Highlights of "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops:2010. ISAAA 42-2010
62. Jonas DA, Elmadfa I, Engel KH, Heller KJ, Kozianowski G, Konig A, Muller D, Narbonne JF, Wackernagel W, Kleiner J (2001) Safety considerations of DNA in food. Ann Nutr Metab 45, 235–254.

63. Kai E, Sawata S, Ikebukuro K, Iida T, Honda T, Karube I (1999) Detection of PCR products in solution using surface Plasmon resonance. Anal Chem 15, 796–800.
64. Kalogianni, D.P., T. Koraki, T.K. Christopoulos and P.C. Ioannou. (2006). Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. Biosensors and Bioelectronics 21: 1069–1076.
65. Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13756–13761.
66. Kay S, Van den Eede G (2001) The limits of GMO detection. Nature Biotechnol. 19, 405.
67. KimYJ, Chaes JS, Chang JK, Kang SH (2005) Microchip capillary gel electrophoresis using programmed field strength gradients for the ultra-fast analysis of genetically modified organisms in soybeans. J. Chromatogr. A. 1083, 179–184.
68. Kinjo M, Rigler R (1995) Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. Nucl Acid Res 23, 1795–1799.
69. Kingsnorth, C.S., Kingsnorth, A.J., Lyonst, P.A., Chwarszczynska, D.M., and Asher, M.J.C. (2003). Real-time analysis of Ploymyxa betae GST expression in infected sugar beat. Molecular Plant pathology 4(3), 171-176.
70. Kjellsson, G., and Strandberg, M. (2001). Monitoring and surveillance of genetically modified higher plants. Guidelines for procedures and analysis of environmental effects. Birk user Verlag, Basel, Switzerland.
71. Klotz A, Einspanier R (2001) Development of a DNA-based screening method to detect cows milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products by PCR-LCR-EIA-technique. Milk Science International – Milchwissenschaft Vol. 56 (2), 67–70.
72. Klotz A, Mayer J, Einspanier R (2002) Carryover of feed-DNA into farm animals: first investigations with pigs, chicken embryos and commercial available chicken samples. Eur. Food Res.Technol.214, 271–275.
73. Klaften M, Whetsell A, Webster J, Grewal R, Fedyk E, Einspanier R, Jennings J, Lirette R, Glenn K (2004) Development of Polymerase Chain Reaction Methods to Detect Plant DNA in Animal Tissues. in: Agricultural Biotechnology: Challenges and Prospects, pp. 83–99; Eds: Bhalgat M.M., Ridley W. P., Felsot A. S., Seiber J. N., ACS Symposium Series 866; American Chemical Society Washington DC.

74. Knight, C.D.; Cove, D.J.; Cuming, A.C.; and Quatrano, R.S. (2002). Mass gene technology. Pp. 285-301. In: Gilmartin, P.M. and Bowler, C. (eds.). Molecular Plant Biology. Vol. 2. Oxford University Press.
75. Kratochvil J, Laffler TG (1994) Nonradioactive oligonucleotide probes for detecting products of the ligase chain reaction. in: Methods in Molecular Biology 28 (Isaac PG, ed.), Humana, Totowa, NJ, USA.
76. Kubik T, Bogunia-Kubik K, Sugisaka M (2005) Nanotechnology on duty in medical applications. Curr. Pharm. Biotechnol. 6, 17–33.
77. Kuiper (1999) Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel food derived from genetically modified organisms. Food Control 10, 339–349.
78. Kuiper HA, Kok EJ, Engel KH. (2003) Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. Curr Opin Biotechnol. 14, 238–243.
79. Knut J. Heller (2006), Genetically Engineered Food: Methods and Detection, 2nd, Updated and Enlarged Edition.
80. Larsen LA, Christiansen M, Vuust J, Andersen PS (2001) Recent developments in high-throughput mutation screening. Pharmacogenomics 2, 387–399.
81. Lee DK, Seok SJ, Jang IC, Nahm BH, Kim JK (1998) Triprimer-PCR method: rapid and reliable detection of transgenes in transgenic rice plants. Mol Cell 8, 101–106.
82. Le Gall G, Colquhoun IJ, Davis AL, Collins GJ, Verhoeyen ME. (2003) Metabolite profiling of tomato (Lycopersicon esculentum) using 1H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. J Agric Food Chem. 51, 2447–2456.
83. Leimanis S, Hoyez N, Hubert S, Laschet M, Sauvage E, Brasseur R, and Coyette J (2006). A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. Journal of bacteriology 188 (17):6298-307
84. Lipp, M., Brodmann, P. Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E. (1999). IUPAC Collaborative trial study of a method to detect the presence of genetically modified organisms in soy beans and maize. J AOAC Int., 82, 923-928.
85. Lipp M., Anklam E., Stave JW (2000) Validation of an immunoassay for detection and quantitation of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. J. AOAC Int. 89, 919–927.
86. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. Nature Genet. 19, 225–232.

87. Lubeck, M. (2001). Detection of genetically modified plants- methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm
88. Lübeck, P. S., P. Wolffs, S. L. On, P. Ahrens, P. Radstrom, and J. Hoorfar. (2003). Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: assay development and analytical validation. Appl. Environ. Microbiol. 69:5664-5669.
89. Malek L, Sooknanan R, Compton J (1994) Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). in: Methods in Molecular Biology 28 (Isaac PG, ed.), Humana Press, Totowa, NJ.
90. Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A (2001) A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 42 (1), 24–32.
91. Matsuoka T, Kuribara H, Takubo K, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A (2002) Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (Zea mays). J Agric Food Chem 50, 2100–9.
92. MacCormick, C.A., Griffin, H.G., Underwood, H.M., and Mason, M.J. (1998). Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. J. Appl. Microbiol. 84, 969-980.
93. McCabe MS, Power JB, de Last AM, Davey MR (1997) Detection of single-copy genes in DNA from transgenic plants by nonradioactive Southern blot analysis. Mol Biotechnol. 7, 79–84.
94. McDonnell JM (2001) Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. Curr Opin Chem Biol 5, 572–577.
95. Meyer, R., Chardonnens, F., Hübner, P. and Lüthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products. Lebensm. Unters. Forsch. 203, 339-344
96. Minunni M, Tobelli S, Pratesi S, Mascini M, Piatti P, Bogani P, Buiatti M, Mascini M (2001) A piezoelectric affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. Anal Lett 34, 825–840.
97. Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJ, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JP, Zagon J (2004) Detection and traceability of

genetically modified organisms in the food production chain. Food Chem Toxicol. 42, 1157–1180.

98. Moller R, Csaki A, Kohler M, Fritzsche W (2000) DNA probes on chip surfaces studied by scanning force microscopy using specific binding of colloidal gold. Nucleic Acids Res. 28, e91.

99. Moore, S., Payton, P., and Giovannoni, J. (2002). DNA micro-arrays for gene expression analysis. Pp. 65-76. In: Gilmartin, P.M. and Bowler, C. (eds.). Molecular Plant Biology. Vol. 2. Oxford University Press.

100. Moses S, Brewer SH, Lowe LB, Lappi SE, Gilvey LB, Sauthier M, Tenent RC, Feldheim DL, Franzen S. (2004) Characterization of single- and doublestranded DNA on gold surfaces. Langmuir. 20, 11134–11140.

101. Morisset, D.; David Dobnik, Sandrine Hamels, Jana Z˘ ell and Kristina Gruden (2008) NAIMA: target amplification strategy allowing quantitative on-chip detection of GMOs

102. Muller O, Hahnenberger K, Dittmann H, Yee H, Nagle R, Iisley D (2000) A microfluidic system for high speed reproducible DNA sizing and quantification. Electrophoresis 21, 128–134.

103. Munchow G, Dadic D, Doffing F, Hardt S, Drese KS. (2005) Automated chip-based device for simple and fast nucleic acid amplification. Expert Rev Mol Diagn. 5, 613–620.

104. Nicholl, D.S.T. (2002). An introduction to genetic engineering. Second edition. Cambridge University Press.

105. Nielsen KM, Townsend JP (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. Nature Biotechnol. 22, 1110–1114.

106. Niesters HG (2001) Quantification of viral load using real-time amplification techniques. Methods 25, 419–429.

107. Obeid PJ, Christopoulos TK, Ioannou PC. (2004) Rapid analysis of genetically modified organisms by in-house developed capillary electrophoresis chip and laser-induced fluorescence system. Electrophoresis. 25, 922–930.

108. Paabo S (1993) Ancient DNA Sci. Am. 269, 86–92.

109. Pauli U, Liniger M, Zimmermann A (1988) Detection of DNA in soybean oil. Food Res. Technol. 207, 264–267.

110. Pietsch P, Waiblinger HU (2001) Quantification of genetically modified soybeans in food with the LightCycler system. in: Rapid cycle real-time PCR (Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds), Springer, Berlin.

111. Phillip McClean1998. Plant Molecular Biology Reporter 16: 257–262, 1998. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

112. Phillip McClean (1998). Cloning and Cloning vectors. http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc731/cloning/cloning2.htm

113. Phillip McClean (1998). *Agrobacterium*-mediated Transformation. http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc731/transgenic/transgenic2.htm

114. Popping B (2001) Methods for the detection of genetically modified organisms: Precision, pitfalls, and proficiency. Int Lab 31, 23–29.

115. Quirasco M, Schoel B, Plasencia J, Fagan J, Galvez A. (2004) Suitability of real-time quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for cry9C detection in Mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. J AOAC Int. 87 639–646.

116. Querci, M., Jermini, M. And Van den Eede, G. (eds.). (2006). Training Course on "The analysis of Food samples for the presence of genetically modified organisms". User Manual. DG Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission, Luxemburg: Office for Official publication of the European communities. 229 pp. ISBN: 92-79-02242-3.

117. Rapley R (1998) Polymerase chain reaction. in: Molecular Biomethods Handbook. (Rapley R, Walker JM), Humana Press, Totowa, NJ, USA.

118. Rasco-Gaunt S, Riley A, Barcelo P, Lazzeri PA. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. Plant Cell Reports 19:118-127.

119. Reischl U, Wittwer C, Cockerill F (2002) Rapid Cycle Real-time PCR methods and Application – Microbiology and food analysis. Springer, Berlin.

120. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I (1992) PCR: Clinical diagnostics and research. Springer, Berlin.

121. Roseboro K (2000) Standardizing GMO testing. Food Proc USA 61, 61–63.

122. Serge Leimanis, Marta Herna´ ndez, Sophie Ferna´ ndez, Francine Boyer, Malcolm Burns, Shirin Bruderer, Thomas Glouden, Neil Harris, Othmar Kaeppeli, Patrick Philipp, Maria Pla, Pere Puigdome`nech, Marc Vaitilingom, Yves Bertheau and

Jose´ Remacle, (2006), A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients

123. Stave, J.W., Magin, K., Schimmel, H., Lawruk, T.S., Wehling, P., and Bridges, A. (2000). AACC collaborative study of a protein method for detection of genetically modified corn. Cereal Foods World 45, 497-501.

124. Studer, E,.Dahinden, I.,luthy,J.and Hubner,P.(1997). Nachweis des genetisch veranderten " Maximizer-Mais mittels der ploymerasekettenreaktion (PCR). Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygien 88, 515-524.

125. Sabelli PA (1998) Southern Blot Analysis. in: Molecular Biomethods Handbook. (Rapley R, WalkerJM), Humana Press, Totowa, NJ, USA.

126. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

127. Sanger F., Nicklen S., and Coulsen AR., 1997. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 74:5463-5468.

128. Siesler D, Minnick N, Dvorak N, Moore L, Isaac P, Crystele C, Malandro MS (2000) Quantitative detection of transgenes in genetically modified plants by Real-time PCR. Plant & Animal Genome VIII conference. San Diego, CA 9-12 January 2000.

129. Shanahan D., Stokes P., Bums M. (2006). A novel method for the detection of Roundup ready soya using liquid chomatograhy –electrospray ionization mass spectrometry. EuroFood Res Technol 225 (3/4): 483-91.

130. Somma, M. and Querci, M. (2001). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. In: Querci et al. (2006).

131. Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A., and Fletcher, D.S. (1987). "A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis." Nucleic Acids Res. 15, 5925- 5943.

132. Storhoff, J.J., Lucas, A.D., Garimella, V., Bao, Y.P., M¨uller, U.R., 2004a. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. Nat. Biotechnol. 22, 883–887.

133. Storhoff, J.J., Marla, S.S., Bao, P., Hagenow, S., Mehta, H., Lucas, A., Garimella, V., Patno, T., Buckingham, W., Cork, W., Muller, U.R., 2004b. Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. Biosens. Bioelectron. 19, 875–883.N

134. Taverniers, I., van Bockstaele, E. and De Loose, M. 2004. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. Anal Bioanal Chem., 378, 1198-207

135. Taverniers, I., Windels, P., Vaitilngom M.; Milcamps A.; van Bockstaele, E. and Van den Eede G. et al. 2005. Event-spesific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt 176 and GA21 maize and transgenic GT73 canola. J. agri Food Chem., 53, (8) 3041-52.

136. Terry, C. F. and Harris, N. 2001. Event specific detection of Roundup Ready soya using two different real time PCR detection chemistries. Eur. Food Res. Technol., 213, 425-431.

137. Terry CF, Shanahan DJ, Ballam LD, Harris N, McDowell DG, Parkes HC. 2002. Real-time detection of genetically modified soya using Lightcycler and ABI 7700 platforms with TaqMan, Scorpion, and SYBR Green I chemistries. J AOAC Int. 85(4):938-44.

138. Tyagi, S. and Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnol. 14, 303-308.

139. User Bullettin #5. Multiplex PCR with TaqM VIC probes .ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. PE Applied Biosystems, 1998. European Commission Joint Research Centre publications.

140. Vaitilingom M., Pijnenburg H., Gendre F., Brignon P. (1999). "Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReadyWTM soybean in some representative foods". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 5261-5266.

141. Van Duijn GJ, van Biert R, Bleeker-Marcelis H, Van Boeijen I, Ada AJ, Jhakrie S, Hessing M (2002) Detection of genetically modified organisms in foods by protein and DNA-based techniques: bridging the methods. J AOAC Int 85, 787–791.

142. van Hal N.L.W., Vorst O., Kok E.J., Van Houwelingen A.M.M.L, Peijnenburg A.A.C.M., van Tunen A.J., and Keijer J., (2000). The application of DNA micro-arrays in gene expression analysis. J. Biotechnology, 78, 271-280.

143. Van den Eede G, Aarts H, Buhk HJ, Corthier G, Flint HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, van der Vossen J, von Wright A, Wackernagel W, Wilcks A (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. Food Chem Toxicol. 42, 1127–1156.

144. Walter J and Biggin MD (1996) DNA binding specificity of two homeodomain proteins in vitro and in Drosophila embryos. Proc Natl Acad Sci USA, 93, 2680–2685.,

145. Wang, M.C., Bohmann, D., Jasper, H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in Drosophila. Dev. Cell 5(5): 811--816.

146. Weijdeven, Van de, F. (2003). METHODS OF DETERMINING GMOs IN FEEDS AND FEED INGREDIENTS. http://www.afma.co.za/AFMA-Template/sept-method.htm

147. Wong ML, Medrano JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 39(1):75-85

148. Yman, I.M. (2000). Qualitative methods for the analysis of foods derived from genetically modified organisms. Pp. 16-21. In: NMKL, 2000. Seminar on genetically modified foods. Denmark.

149. Zagon, M., Schauzu, H., Broll, K., Bgl, W., and Winkler, D. (1998). Methods for the detection of genetic modifications in transgenic organisms. bGVV Report 06/1998.

150. Zaid, A.;Hughes, H.G.; Porceddu, E.and Nicholas, F. (2001). Glossary of Biotechnology for food and agriculture. A revised and Augmented edition of the glossary of biotechnology and genetic engineering. FAO Research and Technology paper 9. FAO, Rome.

151. Zhang Y., Buchholz F., Muyrers JP and Stewart AF., 1998. A new Logic for DNA engineering using recombination in Escherichia Coli. Nat. Genet. 20: 123-128.

152. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TC, Li H. Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe. Gene. 1998 May 12;211(2):277-85.

153. Zhu, J., Oger, M. P., Schrammeijer, B., Hooyckaas, J. P., Farrand, K. S. and Wians, V. S. 2000. The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. J. Bacteriol., 182, 3885-3895.

Internet links

http://www.agbios.com/dbase.php.

http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops/how.html#breeding

http://FMRes/FMPro/-db=ngmomethods.fp5

http://biotech.jrc.it/act_laboratory.htm

http://www.ppws.vt.edu/~sforza/prokaryote/agrobacterium1.jpg

http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.html

Applied Biosystems Sequence Detection Systems

ABI User Bulletins ABI-PRISM 7700 Application Notes 7900HT

RT-PCR Primer Bank

RT-PCR Primer DataBase

RT-PCR Primer Sets

Quantitative PCR Primer Database - QPPD (NCI)

ملحـق 1

المواد الكيماوية،الأدوات والأجهزة والمواد الأخرى المستخدمة في الدورة

Annex 1

Chemicals , Equipments and Other materials used in the course

- **Chemicals**

Agarose	Duchefa Biochemie, Netherlands
Bromophenol blue	USB, in, USA
Boric acid	Fluka Chemika, AG CH-9470 Buchs
B-mercaptoethanol	AVOCADO
Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	ROTH Carl Roth GmbH Germany
Chloroform	SCP Needham market, England
Ethanol 75%	Riedel- de Haën, Germany
Ethidium bromide	Vivantis, Germany
Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)	MEDEX, England
Glucose	
Glacial acetic acid (CH3COOH)	PRS Panreac, Spain
Glycerol	SCP Needham market, England
HCl (hydrochloric acid)	Riedel- de Haën, Germany
Isopropanol	Riedel- de Haën, Germany
isoamyl alcohol	Scharlan, Spain
Liquid nitrogen	
Na-acetate (CH3COO-Na)	USB in USA
Phenol	SCP Needham market, England
Potassium acetate(CH3COO-K)	Riedel- de Haën, Germany
RNase enzyme	USB in USA
SDS (sodium dodecyl sulfate)	USB in USA
Sodium acetate NaOAc	PRS Panreac, Spain
Sodium chloride	Scharlau, European Union
Sodium hydroxide	PRS Panreac, Spain
Sodium thiosulfate	MERCK KGaA, Germany
Tris-(hydroxymethyl)	ROTH Carl Roth GmbH, Germany
Tris- base	Promega, USA
Xylene cyanol	ROTH Carl Roth GmbH, Germany

- ## Equipments

- Autoclave
- Centrifuge AR.15
- Refrigerated Centrifuge
- Water bath
- 1.5 ml minicentrifuge tubes
- Electrophoreses Chamber tray
- Power supply PAC 300
- Gel documentation
- Microwave
- pH-meter
- PCR Thermocycler System
- Real Time PCR , ABI Biosystem 7500, USA
- Sensitive balance
- Table cooling centrifuge
- UV-photometer
- UV-photometer
- Vortex mixer
- Electric grinder
- Incubater GFL 3031
- 0.5 ml Minicentrifuge

- ## Other materials

- Filter papers
- Filter Tipps, 2.5,10,100,1000 and 5000µl (sterile)
- Micropipettes (2.5, 10, 100, 200, 1000.5000 µl)
- PCR optical caps (8 caps/ strip)
- PCR optical vessels (96-well reaction plate)
- PCR reaction vessels 0.5 ml
- Reaction vessels 0.5, 1.5, and 2.0 ml

Annex 2 ملحـق 2

برنامج الدورة التدريبية الإقليمية المتقدمة حول
الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والأمان الحيوي في الأغذية والزراعة
19-24 حزيران 2010 – ايكاردا- حلب- سوريا

ضمن إطار فعاليات مشروع فاو الإقليمي TCP/RAB/3202 بعنوان:

"تعزيز القدرات نحو تأسيس قاعدة إقليمية للكشف عن الكائنات الحية المعدلة وراثياً"

الجهات المنظمة للدورة:

ايكاردا– الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة

PROGRAM

Schedule of the Training Course on
"GMO Detection and Biosafety"
Organized by: ICARDA , GCSAR , FAO
held at ICARDA, Aleppo, Syria 19 - 24 June 2010

Within the framework
of the

FAO project TCP/RAB/3202 on GMO Detection and Biosafety

Date التاريخ	Activity النشـاط	Location المكان	Resp. Person/s الشخص المسؤول
السبت Saturday **19 June**			
09:00-10:00	ICARDA Slide show عرض عام عن نشاطات ايكاردا	Auditorium مدرج ايكاردا	HRDU M. Baum, F. Khatib باوم- فاتح
10:00- 10:30	Coffee break استراحة		
10:30-12:00	Introduction to ICARDA laboratory. Working in groups التعرف على المخابر،تقسيم المشاركين إلى مجموعات	Conference room قاعة المحاضرات	M. Baum F. Khatib باوم- فاتح- ناهد
12:00-13:00	Lunch غداء	Cafeteria كافتريا	
13:00-16:00	Transformation technology: Agrobacterium and gene gun systems تكنولوجيا التحوير الوراثي بوساطة الأغروباكتريا والمدفع الجيني	Laboratory المخبر	F. Khatib A. Abdul Kader N. Al Sokhny فاتح- أحمد- ناهد

الأحد Sunday, June 20			
09:00-10-00	DNA extraction and sample Preparation استخلاص ال دنا وتحضير العينات	Conference room قاعة المحاضرات	N. Foti فوتي
10:00-13:00	DNA extraction from plant and processed material استخلاص الـ دنا من النبات ومن مواد غذائية مصنعة	Laboratory المخبر	F. Khatib N. Al Sokhny G. Abou-Sleymane N. Al Assad A. Abdul Kader فاتح- ناهد- غريتا- نور-أحمد
13:00-14:00	Lunch غداء	Cafeteria	
14:00-15:00	Measuring DNA concentration and purity, agarose gel for DNA quality قياس تركيز ونقاوة ال دنا هلامة الأغاروز	Laboratory المخبر	F. Khatib N. Al Sokhny G. Abou-Sleymane N. Al Assad فاتح- ناهد- غريتا- نور-أحمد
الأثنين Monday, June 21			
09:00-10:00	PCR theory and PCR for GMOs testing بي سي أر واستخداماته للكشف عن المواد المعدلة وراثياً(نظري)	Conference room قاعة المحاضرات	G. Abou-Sleymane غريتا
10:00 -13:00	Preparing for GMO Detection: Screening for 35S promoter and nos terminator التحضير للكشف عن المواد المعدلة وراثياً: الكشف عن 35S و nos	Laboratory المخبر	F. Khatib N. Al Sokhny G. Abou-Sleymane N. Al Assad A. Abdul Kader فاتح- ناهد- غريتا- نور-أحمد
13:00-14:00	Lunch غداء	Cafeteria	
14:00-15:00 15:00-17:00	Preparing and running of agarose gel Detection of transgenic Roundup ready Soybean by nested PCR كشف الصويا بالبي سي ار المعشش	Laboratory المخبر	F. Khatib N. Al Sokhny G. Abou-Sleymane N. Al Assad فاتح- ناهد- غريتا- نور-أحمد
الثلاثاء Tuesday, June 22			
09:00-10:30	Nested PCR- continued GMO specific PCR, Detection of the CTP/EPSPS gene متابعة ا لبي سي أر المعشش، كشف المورثة CTP/EPSPS	Laboratory المخبر	F. Khatib N. Al Sokhny G. Abou-Sleymane N. Al Assad فاتح- ناهد- غريتا- نور-أحمد
10:30-11:00	Break استراحة		
10:30-12:30	Principles of Quantitative Real time PCR مبادىء ا ل بي سي أر الكمي بالزمن الحقيقي	Conference room قاعة المحاضرات	N. Foti G. Abou-Sleymane فوتي - غريتا
12:30-13:30	Lunch غداء		

13:30-15:00	Preparing and running of agarose gel Staining the gel and results analysis تحضر هلامة الأغاروز-الصبغ وتصوير النتائج	Laboratory المخبر	F. Khatib N. Al Sokhny G. Abou-Sleymane N. AlAssad فاتح- ناهد- غريتا- نور-أحمد
الأربعاء **Wednesday, June 23**			
09:00-10:00	Setup of inhibition run بي سي أر الكمي بالزمن الحقيقي	Laboratory المخبر	N.Foti G. Abou-Sleymane فوتي – غريت- جويس
10:00-10:30	Break استراحة		
10:30-12:30	Set up of the RT-PCR using the 35S kit بي سي أر الكمي بالزمن الحقيقي **35S kit**	Laboratory المخبر	N.Foti G. Abou-Sleymane فوتي – غريت- جويس
12:30-13:30	Lunch غداء		
13:30-15:30 15:30-17:00	Set up of the RT-PCR event specific method for TC1507 maize quantification بي سي أر الكمي بالزمن الحقيقيذرة **TC1507** Data analysis of inhibition run and the 35s kit runs تحليل النتائج-بي سي أر الكمي بالزمن الحقيقي-**35s kit**	Laboratory المخبر	N. Foti G. Abou-Sleymane فوتي – غريت- جويس
الخميس **Thursday, June 24**			
09:00-10:00	Data analysis of RT-PCR event specific method for TC1507 maize quantification تحليل النتائج-تحديد كمي ذرة **TC1507**	Laboratory المخبر	N.Foti, G. Abou-Sleymane فوتي – غريت- جويس
10:00-10:30	Break استراحة		
10:30-12:30	General Discussion مناقشة عامة Evaluation, Certificates, تقييم Concluding Remarks and Closing Ceremony كلمات ختامية وحفل توزيع الشهادات		All الجميع M. Baum مايكل معاوني مدير ايكاردا-مدير التدريب
12:30-13:30	Lunch غداء		
13:30	Leave to Damascus مغادرة إلى دمشق		
الجمعة **Friday, June 25**	Departure of participants مغادرة المشاركين		
Friday, June 25	Departure of participants		

ملحق 3 أسماء المشاركين في الدورة

Annex 3

List of Participants in the Training Course on
Detection of Genetic Modified Organisms (GMOs) and Biosafty for Food and Agriculture
held at* ICARDA *Headquarter*, Aleppo, Syria *from 19 to 24 June 2010

Name (Dr. Mr. Ms) /Country: الاسم / الدولة	**Position / Institution** / المهنة مركز العمل	**Contact address:** / عنوان العمل الاتصال
Dr. Yousef Husein Tawalbeh ***Jordan***	*Head/Risk Analysis and Studies Department, Food and Drug Administration*	*Risk Analysis and Studies Department, Food and Drug Administration, Jordan*
		Office Tel: + 962-799014820
		Mobile: +962 777512568
		E-Mail : Yousef.tawalbeh@jfda.jo
Dr. Ibrahim M. Al-Rawashdeh ***Jordan***	*Director of Biotechnology Unit/National Center for Agricultural Research and Extension (NCARE)*	*National Center for Agricultural Research and Extension (NCARE), P.O. Box 639, Baqa', 1931 Amman, Jordan*
		Office Tel: +962-06-4725071
		Office Fax: +962-06-4726099
		Mobile: +962 777 514417
		E-Mail: Irawashdeh2002@yahoo.com
Mr. Georges Saad ***Lebanon***	*Head/Plant Quarantine Department at Beirut Port*	*Plant Quarantine Department, Beirut Port Import, Export and Plant Quarantine Service, MoA*
		Office Tel: +961-1-281246
		Mobile: +961-3 935439
		E-Mail : cowsmaster@hotmail.com
Mr. Ali Chehade ***Lebanon***	*Research Assistant/ Lebanese Agricultural Research Institute (LARI)*	*Lebanese Agricultural Research Institute (LARI), Dep. of Plant Biotechnology Tal Amara, Rayak, Zahlé, .PO. Box 287, Bekaa, Lebanon*
		Office Tel: +961 8900037
		Office Fax: : +961 8901577
		Mobile: +961 3625047
		E-Mail : alichehade@hotmail.com

Mr. Ahmed Elbitar ***Lebanon***	*Research Assistant/ Lebanese Agricultural Research Institute (LARI)*	*Lebanese Agricultural Research Institute (LARI), Dep. of Plant Biotechnology Tal Amara, Rayak, Zahlé, P.O. Box 287, Bekaa, Lebanon*
		Office Tel: +961 8 900 037/47
		Office Fax: +961 8 901 577
		Mobile: +961 3 620 325
		E-Mail: abitar@lari.gov.lb/ ahmadbittar@hotmail.com
Mr. Mohamed Elsiddig Ahmed Ali ***Sudan***	*Researcher/GMO Detection Lab, Biotechnology and Biosafety Center*	*Agricultural Research Corporation (ARC), Biotechnology and Biosafety Center, GMO Detection Lab, Sudan*
		Office Tel: +249122553340
		Office Fax: +249 51184213
		Mobile: +249 9067212
		E-Mail : mohsa2006@hotmail.com
Ms. Ibtehag Mahgoub Almobarak Ibaid ***Sudan***	*Director/Food Safety Section, Environmental, Health and Food Control Administration*	*Food Safety Section, Environmental, Health and Food Control Administration Federal Ministry of Health, Sudan*
		Office Tel: +249 155145620
		Office Fax: +249 155145620
		Mobile: +249 912468362
		E-Mail : ibtehagmoba@yahoo.com
Ms. Maha Abdalla Mohamed Ibrahim ***Sudan***	*GMO detection Lab, SSMO, Port Sudan, Red Sea branch-Sudan*	*Sudanese Standards and Metrology Organization – Red Seea branch, Sudan*
		Office Tel: +249 311839454 Ext. 125
		Office Fax: +249 311828889
		Mobile: +249 12383085
		E-Mail: freere1960@yahoo.com
Dr. Abdelbagi Mukhtar Ali ***Sudan***	*Director/Biotechnolo gy and Biosafety Research Center*	*Agricultural Research Corporation (ARC), Biotechnology and Biosafety Research Center, Shambat, Khartoum North, Sudan*
		Mobile: +249 9121 52 747
		E-Mail : abdmali@yahoo.com
Dr. Ahmad Omar Baghdady ***Syria***	*Researcher*	*GCSAR, Aleppo Research Center*, Al-Midan, Al-Zeraa Square - P.O.Box 4195 - Aleppo - Syria
		Office Tel: +963 21 4647200
		Office Fax:+963-21 4644600
		Mobile: +963-967959229
		E-Mail : aobagh@yahoo.com

Ms. Nabila Mohamad Ali Bacha ***Syria***	*PhD Student, Research Assistant/General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR)*	*General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR)), Douma, P.O. Box 113, Damascus, Syria*
		Office Tel: +963 11 57386303
		Office Fax: +963 11 57386303
		Mobile: +863 933 750079
		E-Mail : nalibasha@live.com
Mr. Mohamad Zafer Assaf ***Syria***	*Head/Potato Sub Division, Administration of Plant Production*	*Ministry of Agriculture, Administration of Plant Production, Syria*
		Office Tel: +963 11 2115042/2322124
		Office Fax: +963 11 2222690
		Mobile: +963 956 631941
		E-Mail: zaferassaf@yahoo.com
Ms. Demah Alhaj Turki ***Syria***	*Researcher/General Commission for Biotechnology (GCBT)*	*General Commission for Biotechnology (GCBT), Syria*
		Office Tel: +963 11 5138306
		Office Fax: +963 11 5130104
		Mobile: +963 967 378 378
		E-Mail : gcbt@mail.sy
Ms. Ruba Ghassan Naman ***Syria***	*Researcher/Ministry of Economy, Central Lab*	*Ministry of Economy, Central Lab, Syria*
		Office Tel: +963 11 7811341
		Mobile: +963 932 086436
		E-Mail : naman_ruba@yahoo.com
Mr. Anas Dameriha ***Syria***	*Researcher/General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR)*	*General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Douma, P.O. Box 113, Damascuc, Syria*
		Office Tel: +963 11 57386303
		Office Fax: +963 11 57386303
		Mobile: +963 992 692419
		E-Mail : anas-dameriha@hotmail.com
Mr. Wadei Ahmed Abdulrab Al-Selwey ***Yemen***	*Assistant Researcher*	*Agricultural Research and Extension Authority (AREA)*
Mr. Shukri Abdulkarim Mohammed Nasher ***Yemen***	*Microbiologist/ Microbiological Food Analysis Laboratory, YSMQCO*	*Microbiological Food Analysis Laboratory, Yemen Standardization, Metrology and Quality Control Organization (YSMQCO), Sana'a, Yemen*
		Office Tel: +967 1 469971
		Mobile: +967 733161988
		E-Mail : shukri1976@yahoo.com
Mr. Abdullah Qassem Al-Rawhani ***Yemen***	*Head/Seed Registration Section, Ministry of Agriculture and Irrigation*	*Ministry of Agriculture and Irrigation, Seed Lab, Seed Registration Section, P.O. Box 2805, Sana'a, Yemen*
		Office Tel: +967 1 251 849
		Mobile: +967 7126 88856
		E-Mail : ab.rohani@yahoo.com

Annex 4 ملحق 4 . أسماء المحاضرين

List of Instructors /Resource Persons in the Training Course on
Detection of Genetic Modified Organisms (GMOs) and Biosafty for Food and Agriculture
ICARDA, Aleppo, Syria 19 - 24 June 2010

Name (Dr. Mr. Ms) /Country: الاسم / الدولة	Position / Institution المهنة / مركز العمل	Contact address: عنوان العمل / الاتصال
Dr. Michael Baum ***Germany***	*Director/Biodiversity and Integrated Gene Management Program (BIGM)*	*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA, P.O. Box 5466, Aleppo, Syria*
		Office Tel: +963-21 2213433
		Office Fax: +963-21-2213490
		Mobile: +963 944 428358
		E-Mail: m.baum@cgiar.org
Dr. Nicoletta Foti ***Italy***	*Researcher/Joint Research Center (JRC)*	*Joint Research Center (JRC), Molecular Biology and Genomics Unit (MGB), Ispra, Italy*
		Office Tel: +39 0332 78 6333
		Office Fax: +39 0332 78 9333
		E-Mail: nicoletta.foti@jrc.ec.europa.eu
Dr. Gretta Abou Sleymane ***Lebanon***	*Researcher/American University of Science & Technology (AUST)*	*American University of Science & Technology (AUST), Faculty of Health Sciences-GMO Laboratory, Ashrafieh, Alfred Naccache Avenue, Beirut, Lebanon*
		Office Tel: +961 1218716 Ext. 277
		Office Fax:
		Mobile: +961 3489790
		E-Mail: gretta.abousleymane@gmail.com
Ms. Joyce Sakr ***Lebanon***	*Researcher/American University of Science & Technology (AUST*	*American University of Science & Technology (AUST), Ashrafieh, Alfred Naccache Avenue, Beirut, Lebanon*
		Office Tel: +961 1218716 Ext. 447
		Mobile: +961 3509831
		E-Mail: joyce.s@live.com

Dr. Fateh Khatib ***Syria***	*Lecturer and Researcher/ Aleppo University, Faculty of Agriculture*	*Aleppo University, Faculty of Agriculture, Aleppo, Syria*
		Office Tel: +963-21 2213433
		Office Fax: +963-21-2213490
		Mobile: +963 966 459779
		E-Mail : f.khatib@cgiar.org
Dr. Ahmad Abdulkader ***Syria***	*Head/Biosafety and Genetic Engineering Sections, GCSAR*	*General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Douma, P.O. Box 113, Damascus, Syria*
		Office Tel: +963 11 57386303
		Office Fax: +963 11 57386303
		Mobile: +963 956 74 9671
		E-Mail : ahmad59@gmx.de
Dr. Nabeel Al Ahmad Beig ***Syria***	*Consultant & Head/ Institutional Biosafety Committee, GCSAR*	*General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Douma, P.O. Box 113, Damascus, Syria*
		Office Tel: +963 11 57386303
		Office Fax: +963 11 5757992
		Mobile: +963 944 327390
		E-Mail : nabeel-beig@hotmail.com
Ms. Nour Alassad ***Syria***	*PhD Student & Research Assistant/General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR)*	*General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Douma, P.O. Box 113, Damascus, Syria*
		Office Tel: +963 11 57386303
		Office Fax: +963 11 57386303
		Mobile: +963 956 427669
		E-Mail: Bionoor@hotmail.com
Ms. Nahed Alsokhni ***Syria***	*Research Technician/ Biotechnology Lab, ICARDA*	*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), P.O. Box 5466, Aleppo, Syria*
		Office Tel: +963 21 2213433/2691 2472
		Office Fax: +963 21 2213490
		Mobile: +963 955 347802
		E-Mail: n.alsokhny@cgiar.org

END

الدليـــل النظـري والعملـي

للدورة التدريبية الإقليمية حول

"الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والأمان الحيوي في الأغذية والزراعة"

١٩-٢٤ حزيران ٢٠١٠ - ايـكاردا - حلـب - سـورية

إعـــداد

د. أحمـد عبـد القـادر - د. غـريتـا أبو سـليمان - د. فاتـح الخطيب

جويس صقر - د. مايـكل باوم

ترجمـة

د. أحمـد عبـد القـادر - د. فاتـح الخطيب

د. نبيـل الأحمـد بـك - د. حسـين الزعبي

الجهات المنظمة للدورة

الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)

منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (فاو)

مشروع فاو الإقليمي TCP/RAB/3202

"تعزيز القدرات نحو تأسيس قاعدة إقليمية للكشف عن الكائنات الحية المعدلة وراثياً"

©2011 منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO)
المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA)
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية (GCSAR)
جميع الحقوق محفوظة لمنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة

لا يجوز استنساخ أو تخزين أو تحويل أي جزء من هذا الكتاب إلى أي شكل أو وسيط مادي آخر، سواء كان الكترونياً أو مطبوعاً أو مصوراً أو مسجلاً الا باذن خطي من الناشر

الاقتباس المرجعي المقترح:
عبد القادر،أ.، أبو سليمان،غ.، الخطيب، ف.، صقر،ج. باوم، م. (٢٠١١). الدليـــــل النظري والعملي للدورة التدريبية الإقليمية حول الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والأمان الحيوي في الأغذية والزراعة. ١٩-٢٤ حزيران،٢٠١٠، ايكاردا، حلب، سوريا. اصدار: منظمة الأغذية والزراعة، فاو، دمشق. ١٣٥ ص + x

الكلمات المفتاحية: الكشف عن المواد المعدلة وراثياً - الأمان الحيوي – تقانات حيوية

اعـــــــــداد

د. أحمـد عبـد القـادر
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- قسم التقانات الحيوية- دوما- ص.ب. ١١٣- دمشق- سورية
البريد الالكتروني: ahmad59@gmx.de

د. غريتـا أبو سـليمـان
الجامعة الأمريكية للعلوم والتكنولوجيا - كلية العلوم الصحية- مخبر تحليل المواد المعدلة وراثياً- بيروت- لبنـان
البريد الالكتروني: gretta.abousleymane@gmail.com

د. فاتـح الخطيب
جامعة حلب- كلية الزراعة- قسم وقاية النبات – حلب- سورية
البريد الالكتروني: f.khatib@cgiar.org

جويس صقر
الجامعة الأمريكية للعلوم والتكنولوجيا- كلية العلوم الصحية- مخبر تحليل المواد المعدلة وراثياً- بيروت- لبنـان
البريد الالكتروني: joyce.s@live.com

د. مايـــكل بـاوم
المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)- ص.ب. ٥٤٦٦ - حلب – سورية
البريد الالكتروني: m.baum@cgiar.org

ترجمـــــة

د. أحمـــد عبـــد القـــادر* و د.فـاتح الخطيب و د. نبيـل الأحمـــد بـك* و د. حســين الزعـبي***
* الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- دوما- ص.ب. ١١٣- دمشق- سورية
** جامعة حلب- كلية الزراعة- قسم وقاية النبات – حلب- سورية

تصـــــريح

الآراء الواردة هنا هي آراء المؤلفين، ولا تمثل بالضرورة آراء منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (فاو) أو المنظمات التابعة لها. وإن ذكر أي شركة معينة أو منتج لأحد المصنعين سواء كان محمياً أو غير محمي، لا تعني أن الفاو تفضلها على أخرى مماثلة في طبيعتها لم تذكر هنا. لا تعبر المادة المطروحة والعبارات المستخدمة في هذا الاصدار العلمي إطلاقاً عن رأي دول الجهات المشاركة في إعدادها ولا رأي منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (فاو) أو المنظمات التابعة لها بخصوص الوضع القانوني لأي دولة أو إقليم، أو مدينة أو منطقة ينتمي لها المؤلفون، ولا بخصوص رسم حدودها.

شـــــــــــــــكـــر

إن هذا الـدليـــــل النظـــري والعـمـلـي هو أحد نتائج المشروع الإقليمي لمنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (فاو)، TCP/RAB/3202(D) بعنوان: "تعزيز القدرات نحو تأسيس قاعدة إقليمية للكشف عن الكائنات الحية المعدلة وراثياً" والذي تم اعداده للدورة التدريبية الإقليمية حول "الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والأمان الحيوي في الأغذية والزراعة" والتي أقيمت في ايكاردا- حلب- سورية خلال الفترة بين ١٩-٢٤ حزيران ٢٠١٠ .

يود مؤلفوا هذا الدليل انتهاز هذه الفرصة ليعبروا عن جزيل شكرهم لكل من دعم هذه الدورة وساهم في اعداد هذا الدليل.

شكر خالص وعميق للمديرة الفنية للمشروع الحالي ومديرة المصادر الوراثية النباتية والبذور وقسم إنتاج ووقاية النبات في الفاو في روما الدكتورة **غوش كاكولي** لدعمها الكبير لإعداد وطبع هذا الدليل ولجهودها الجمة المتواصلة ودعمها غير المحدود طوال فترة المشروع وحتى اكتمال نجاح تنفيذه.

خالص الشكر والعرفان أيضاً موصول لفريق ايكاردا لتعاونهم في تنظيم هذه الدورة وجهودهم الكبيرة وتقديمهم كافة التسهيلات اللازمة لإنجاحها.

كما نتقدم بخالص الشكر والعرفان لمركز البحوث المشتركة للمفوضية الأوروبية– معهد الصحة وحماية المستهلك ووحدة التقانات الحيوية والكائنات المعدلة وراثياً في مدينة اسبرا ISPRA في ايطاليا، للمساهمة في التدريب العملي والدعم الفني والسماح باستخدام جزء من بروتوكولات المركز في هذا الدليل.

خالص الشكر والتقدير للوزارات والجهات المشاركة في المشروع وشكر خاص لمنسقي المشروع في الدول الستة المشاركة (منى سبليني حلواني (لبنان)– إبراهيم رواشدة (الأردن)، عبد الباقي علي مختار (السودان)، حسين الزعبي (سوريا)، راشد بورشيد (الإمارات العربية المتحدة)، حمود مقبل (اليمن) لجهودهم المستمرة والجادة طوال فترة المشروع مع الشكر الخاص لكل المشاركين في هذه الدورة.

خالص الشكر والعرفان للأستاذ الدكتور **مجدي مدكور**، المستشار الدولي للمشروع، لجهوده الكبيرة المتواصلة وتوجيهاته القيمة ومساهماته الكبيرة طوال فترة المشروع.

وأخيراً وليس آخراً، شكر خاص لفريق الكمتب الاقليمي للفاو RNE/FAO في القاهرة وفريق الفاو FAO في دمشق لدعمهم المتواصل في تنظيم وتسهيل كافة نشاطات المشروع.

وختاماً، نعبر عن امتناننا وشكرنا العميق لكل المشاركين الذين ساهموا في إعداد وجمع وتنسيق هذا المرجع ولكل من ساهم بجد وساعد بأي شكل من الأشكال لضمان إخراج هذا العمل إلى النور باللغتين العربية والانكليزية.

فـهـرس المـحـتـويـات

					الصفحة
				العنـــــــــــــــوان	
				شـــــــــــــــكـر	iii
				فهرس المحتـويـــــات	iv
				قائمة المختصرات والمرادفات	vii
				تـمـهـيـد	viii
				الجزء الأول **المبادىء النظرية حول الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا والأمان الحيوي**	
			١.١	مقـــدمـة	١
			٢.١	مقـــدمـة في الهندســـة الوراثيـــة للمحاصيـل	٣
		١.٢.١		**مصطلحات علمية**	٣
		٢.٢.١		**الهندسة الوراثية في النباتات**	٣
	١.٢.٢.١			ماذا تحتاج لتحوير كائن ما وراثياً؟	٣
	٢.٢.٢.١			خطوات التحوير الوراثي للنباتات	٧
	٣.٢.٢.١			طرائق التحوير الوراثي للنبات	٨
١.٣.٢.٢.١				التحوير بوساطة بكتريا التدرن التاجي	٩
٢.٣.٢.٢.١				التحوير باستخدام مدفع الجينات	١٣
١.٢.٣.٢.٢.١				خلفية نظرية	١٣
٢.٢.٣.٢.٢.١				ما طبيعة الانسجة المستحدمة؟	١٣
٣.٢.٣.٢.٢.١				كيف يعمل المدفع الجيني؟	١٣
٤.٢.٣.٢.٢.١				تحليل معايير قذف الجزيئات	١٦
١.٤.٢.٣.٢.٢.١				كمية الـ دنا البلاسميدي	١٦
٢.٤.٢.٣.٢.٢.١				معايير ترسيب الـ دنا / الذهب	١٦
٣.٤.٢.٣.٢.٢.١				تركيز كلوريد الكالسيوم وسبيرميدين	١٦
٤.٤.٢.٣.٢.٢.١				غليسرول و بولي ايثيل غليكول	١٦
٥.٤.٢.٣.٢.٢.١				كمية جزيئات الذهب	١٧
٦.٤.٢.٣.٢.٢.١				المصادر البديلة وأحجام جزيئات الذهب.	١٧
٧.٤.٢.٣.٢.٢.١				معايير قذف الجزيئات	١٧
٨.٤.٢.٣.٢.٢.١				معايير زراعة الأنسجة	١٨
			٣.١	**طرائق كشف وتحديد العضويات المعدلة وراثياً**	١٩
		١.٣.١		تحويل المعلومات الوراثية من الـ دنا إلى النمط الظاهري.	١٩
		٢.٣.١		ما هي الكائنات المعدلة وراثيا؟	٢١
		٣.٣.١		الـ دنا والبروتين والنمط الظاهري كأهداف لتحاليل الكشف عن التعديل الوراثي.	٢٢
	٤.٣.١			طرائق وخطوات عملية الكشف عن المواد المعدلة وراثياً ومشتقاتها الجزيئية	٢٥

		١.٤.٣.١	**الطرائق المعتمدة على الـ دنا لكشف التعديلات الوراثية**	٢٧
		١.١.٤.٣.١	المخطط العام للاختبار	٢٧
		٢.١ .٤.٣.١	إجراءات أخذ العينات	٢٨
		٣.١.٤.٣.١	استخلاص وتنقية الـ دنا	٢٨
		٤ .١.٤.٣.١	**طرائق تضخيم الـ دنا**	٢٩
		١ .٤ .١.٤.٣.١	"بي سي أر" الكيفي التقليدي	٢٩
		٢.٤.١.٤ .٣.١	الـ "بي سي أر" المتعدد	٣٢
		٣.٤.١.٤ .٣.١	بي سي أر باستخدام قالب الـ رنا الرسول	٣٣
		٤.٤.١.٤ .٣.١	بي سي أر المعشش:	٣٣
		٥.٤.١.٤ .٣.١	بي سي أر شبه الكمي (نقطة النهاية)	٣٣
		٦.٤.١.٤ .٣.١	بي سي أر التقليدي التنافسي شبه الكمي	٣٤
		٧.٤.١.٤ .٣.١	بي سي أر بالزمن الحقيقي	٣٤
		٥.١.٤ .٣.١	**تقنيات كشف دنا بديلة**	٣٨
		١ .٥.١.٤ .٣.١	تهجين لطخة ساوثرن	٣٨
		٢ .٥.١.٤ .٣.١	تحديد تسلسل الـ دنا	٣٩
		٣ .٥.١.٤ .٣.١	المصفوفات الدقيقة للـ دنا	٣٩
		٤ .٥.١.٤ .٣.١	إجراءات التدوير الحراري	٤٠
		٥ .٥.١.٤ .٣.١	التضخيم الايزوحراري	٤١
		٦ .٥.١.٤ .٣.١	تقنيات السوائل الدقيقة وجزئيات النانو	٤١
		٧ .٥.١.٤.٣.١	كشف الطيف الكلي للـ دنا	٤٢
		٨ .٥.١.٣.٤.١	المراقبة التكميلية بواسطة الفوتونات	٤٣
		٩ .٥.١.٤ .٣.١	طرائق مراقبة بيولوجية فريدة	٤٤
		٢.٤ .٣.١	**الطرائق المعتمدة على البروتين**	٤٦
		١ .٢.٤.٣.١	الاليزا	٤٦
		٢ .٢.٤.٣.١	لصاقات/شرائط الانسياب الجانبي	٤٦
		٣ .٢.٤ .٣.١	لطخة وسترن.	٤٧
		٤ .٢.٤.٣.١	الركائز المولدة للون	٤٨
		٣.٤ .٣.١	**الاختبارات الحيوية للمبيد العشبي**	٤٩
			الجزء الثاني **دليل المستخدم العملي حول الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا والأمان الحيوي**	٥٢
١.٢			**قواعد الأمان الحيوي المخبرية**	٥٣
٢.٢			**التحوير الوراثي للقمح بوساطة المدفع الجيني**	٥٨
٣ .٢			**التحوير الوراثي للحمص بوساطة بكتريا التدرن التاجي**	٦٩

٤.٢		**الكشف عن المواد المعدلة وراثياً بالطرائق المعتمدة على كشف الـ دنا المأشوب**	٧٥
	١.٤.٢	العينات المستخدمة	٧٥
	٢.٤.٢	طريقة استخلاص الـ دنا (بروتوكول CTAB)	٧٦
	٣.٤.٢	اختبار نوعية الـ DNA المستخلص وتقدير تركيزه	٨١
	٤.٤.٢	الرحلان الكهربائي بالأغاروز	٨٢
	٥.٤.٢	**الطرائق العملية للكشف الكيفي /النوعي للذرة والصويا المعدلة باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليمراز العادي**	٨٥
	١.٥.٤.٢	الشروط العامة لل بي سي أر	٨٥
	٢.٥.٤.٢	تحليل نواتج ا لـ بي سي أر	٨٦
	٣.٥.٤.٢	التجـربة العمليـة	٨٧
	١.٣.٥.٤.٢	مقدمة	٨٧
	٢.٣.٥.٤.٢	الأدوات	٨٧
	٣.٣.٥.٤.٢	المواد اللازمة / الكواشف	٨٧
	٤.٣.٥.٤.١	البادئات المستخدمة	٨٩
	٥.٣.٥.٤.٢	الشاهد / كونترول	٩٠
	٦.٥.٣.٤.٢	بي سي أر متخصص لكشف مورثة لكتين في فول الصويا	٩١
	٧.٣.٥.٤.٢	بي سي أر متخصص بكشف مورث زين في الذرة	٩٤
	٨.٣.٥.٤.٢	كشف وجود المحفز 35S ووجود المنهي *nos*	٩٨
	١.٨.٣.٥.٤.٢	كشف وجود المحفز 35S	٩٨
	٢.٨.٣.٥.٤.٢	كشف وجود المنهي nos	١٠١
	٦.٤.٢	**الكشف المتخصص بالـذرة MON810 والصويا Roundup Ready® باستخدام الـ nested بي سي أر**	١٠٤
	١.٦.٤.٢	كشـــف الـذرة MON810	١٠٤
	٢.٦.٤.٢	كشف الصويا Roundup Ready®	١٠٩
	٧.٤.٢	**الكشف / التحديد الكمي عن فول الصويا المعدلة وراثياً Roundup Ready® بوساطة الـ "بي سي أر" المتعدد بالزمن الحقيقي**	١١٤
	٨.٤.٢	**طريقة التحديد الكمي المتخصص بسلالة الذرة المعدلة وراثياً TC1507 بوساطة التفاعل السلسلي البوليميرازي "بي سي أر" بالزمن الحقيقي**	١٢٦
		المراجع العلمية	١٣٥
		الملحقات (في القسم الانكليزي من هذا الدليل)	
ملحق ١		المواد الكيميائية، المحاليل، الأجهزة والأدوات	١٤٣
ملحق ٢		برنامج الدورة	١٤٥
ملحق ٣		أسماء المشاركين في الدورة	١٤٨
ملحق ٤		أسماء المحاضرين في الدورة	١٥١

قائمة المختصرات والمرادفات

الاسم الانكليزي	الاختصار	الاسم
Base pair	bp	شفع نيوكليوتيدي
Complementary DNA	cDNA	الـ دنا المكمل (تركيب دنا مكمل للـ رنا الرسول/تركيب السلسلة المكملة للـ دنا بدءاً من الرنا الرسول)
Deoxyribonucleic acid (DNA)	دنا /د.ن.أ/	الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين/ دي اوكسي رايبونيوكليك اسيد
Deoxyribonuclase	DNase	الأنزيم المحلل للـ *DNA*
DNA Ligase		أنزيم الربط
Di Nucleotides triphosphate (dCTP,dATP,dGTP,dTTP)	dNTPs	النوكليوزيدات /النيوكليوتيدات الأزوتية الأربعة
DNA marker (ladder) (lambda DNA)		دنا /مؤشر/ قياسي ذو وزن جزيئي معروف (دنا مستخلص من اكل الجراثيم lambda)
Food Agriculture Organization	فاو FAO	منظمة الاغذية والزراعة للامم المتحدة
Gene construct		مورثة مصطنعة تتألف من مورثة معينة ومورثة معلمة وتسلسلات تحكم (محفز، منهي..)
General Commission for Scientific Agricultural Research	GCSAR	الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
Genetically Modified Organisms	GMOs	الكائنات المعدلة وراثياً
Genome		جينوم/ مجين/ التركيب الوراثي
Gibberelic acid	GA3	حمض الجبرالين
Indol -3-acetic acid	IAA	اندول حمض الخل
Indol-3- butyric acid	IBA	اندول حمض الزبدة
International Center for Agricultural Research in the Dray Areas	ICARDA ايكاردا	المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة
Loading buffer (10X)		سائل التحميل
Murashige and Skoog (1962)	MS	وسط موراشيج وسكوغ
Naphthalene acetic acid	NAA	نفتالين حمض الخل
Optical Density	OD	الامتصاصية /الكثافة الضوئية/
Ploymersae Chain Reaction, **PCR**	/ بي سي أر/	التفاعل التسلسلي البوليميرازي /للبوليمراز /
2,4 -Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D	داي كلوروفينوكسي حمض الخل
Ribonucleic acid (RNA)	رنا /ر.ن.أ/	الحمض الريبي النووي الريبوزي/ رايبونيوكليك أسيد
Reverse Transcriptase-PCR	RT-PCR	تقانة النسخ العكسي للـ رنا الرسول بواسطة التفاعل التسلسلي البوليميرازي (تركيب دنا مكمل للـ رنا الرسول باستخدام أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcriptase
Restriction Enzymes,/ Restriction Endonuclease,/ Endonuclease	RE	أنزيمات التحديد / أنزيمات القطع المحددة /أو أنزيمات الاندونيوكليز
Taq DNA Polymerase	تاغ	أنزيم البلمرة /أنزيم التكثيف/
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA اليزا	اليزا (اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم /البروتين/

تـمهيـد

يتطلب تحقيق الأمن الغذائي الوصول الى زيادات كبيرة في انتاجية وغلة المحاصيل في الدول المستوردة والمصدرة على حد سواء. اذ لا تستطيع معظم الدول في منطقة غرب آسيا وشمال افريقيا تلبية احتياجاتها من المواد الغذائية الأساسية (وبشكل رئيسي القمح وأيضاً الرز) من انتاجها المحلي، ولذلك تعتمد على استيراد الغذاء بدرجات متفاوتة، مما يجعلها من أكثر الدول المعتمدة على الاستيراد في الدول النامية (FAO, 2008). وتشير تنبوءات توازن المواد الغذائية للمنطقة أن الاعتماد على الاستيراد سوف يتزايد بنسبة تقدر بحوالي ٦٤% خلال العشرين سنة القادمة (IFAD, Improving Food Security in the Arab World, 2009). ويتوقع ازدياد الطلب على الحبوب مما يزيد الاستيرادات الصافية من الحبوب الى ٧٣.١ مليون طن في عام ٢٠٢٠، والتي يشكل القمح منها نسبة أكثر من ٥٠% . وهذا ما يستدعي أن تكون برامج تحسين المحاصيل أكثر كفاءة من أجل سد هذه الفجوة الإنتاجية في الغلة بين حقول البحوث وحقول المزارعين. تشمل التقانات الحيوية مجموعة من التقنيات مثل تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية، الانتخاب بمساعدة المعلمات الجزيئية والهندسة الوراثية والتي يمكن أن تساعد في سد فجوة الغلة هذه.

يعتبر عام ٢٠١٠ الذكرى الخامسة عشرة لزراعة المحاصيل المعدلة وراثياً على مستوى تجاري والتي زرعت لأول مرة في عام ١٩٩٦ بمساحة بلغت ١.٧ مليون هكتار لتصل الى ١٤٨ مليون هكتار في ٢٠١٠، أي بزيادة غير مسبوقة تبلغ ٨٧ ضعفاً، مما يجعل المحاصيل المعدلة وراثياً من أسرع تقنيات المحاصيل التي يتم تبنيها في تاريخ الزراعة الحديث. تساهم المحاصيل المنتجة بوساطة طرائق التقانات الحيوية بمواجهة بعض المشاكل التي تواجه المجتمع الدولي والتي تشمل: الأمن الغذائي وتحقيق الاكتفاء الذاتي والاستدامة مما يساهم في تخفيف حدة الفقر والجوع ويساعد في تخفيف بعض الصعوبات المترافقة مع التغير المناخي والارتفاع الحراري العالمي، إذ أن امكانية المحاصيل المعدلة وراثياً من أجل المستقبل هائلة (James 2010).

إن أهم عوائق تبني المحاصيل المعدلة وراثياً في أغلب الدول النامية والذي يستحق تسليط الضوء عليه، هو عدم وجود تشريعات تنظيمية خاصة ووسائل كفء وفعالة من حيث الزمن والتكلفة لدمج كل المعارف والخبرات المكتسبة طوال مدة خمسة عشر عاماً من التشريعات. ان التشريعات التنظيمية الحالية في معظم الدول النامية هي عادة مربكة بشكل غير ضروري، وفي أغلب الحالات من المستحيل تنفيذ التشريع لاعتماد هذه المنتجات والتي تكلف مليون دولار أو أكثر لجعلها غير خاضعة لتنظيمات وقوانين الأمان الحيوي الخاصة بالمواد المعدلة وراثياً، وهذا ما لا تستطيع تحمله أغلب الدول النامية (James, 2010).

أقرت منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (فاو) دعم تمويل مشروع إقليمي (TCP / RAB/3202) لمدة عامين بعنوان:

"تعزيز القدرات نحو تأسيس قاعدة إقليمية للكشف عن الكائنات الحية المعدلة وراثياً"

تشارك فيه كل من لبنان والأردن والسودان وسوريا والإمارات العربية المتحدة واليمن. يهدف هذا المشروع إلى تعزيز القدرات الإقليمية وتبادل المعلومات والخبرات والحوار في مجال المواد المعدلة وراثيا والأمان الحيوي للوصول الى تأسيس قاعدة إقليمية للتعامل وإدارة الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والاجراءات ذات العلاقة من خلال زيادة التعاون الاقليمي ووضع معايير قياسية لاجراءات كشف وتحليل المواد المعدلة وراثياً في المنطقة.

ونظراً للعلاقات التجارية القوية بين دول المنطقة وحدودها المشتركة والاستيرادات الكثيفة للمنتجات الغذائية والاستثمارات الجديدة التي تجذب للمنطقة، فان مثل هذه الشبكة يمكن أن تمثل أيضاً فرصة استثمار اقتصادية. حيث يمكن أن تقلص الاعتماد والتكاليف المترافقة مع نشاطات الكشف عن المواد المعدلة وراثياً من جانب، وتخلق مصادر اضافية من خلال الأجور المستوفاة لقاء الخدمات التي تقدمها المخابر المرجعية المعتمدة من جانب أخر. بالاضافة الى ذلك، ونظراً لأن الكشف عن المواد المعدلة وراثياً شرط أساسي من أجل من الحصول على موافقات الاستيراد والتحرير في البيئة، فان المشروع الحالي يشجع التعاون المثمر بين القطاعين العام والخاص من حيث تنظيم وادارة أفضل للاستيراد ضمن اطار التشريعات الوطنية والاجراءات النظامية. ينتظر من خلال المشروع الحالي أن الدول الستة (لبنان والأردن والسودان وسوريا والإمارات العربية المتحدة واليمن) سوف تقوي الروابط بين الزراعة والبيئة على المستويين الوطني والاقليمي، ويزيد فرص التدريب والمشاركة في الخبرات وتبادل معرفة كيفية اجراءات الكشف عن المواد المعدلة وراثياً. ويهدف المشروع أيضاُ الى زيادة تعاون شمال– جنوب وجنوب– جنوب المنطقة في هذا المجال.

ضمن إطار فعاليات هذا المشروع الإقليمي للفاو (TCP / RAB/3202(D)، نظمت الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في سوريا بالتعاون مع ايكاردا ومنظمة الفاو دورة تدريبية بعنوان:

"الدورة التدريبية الإقليمية المتقدمة حول الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والأمان الحيوي في الأغذية والزراعة"

والتي عقدت في مقر ايكاردا بحلب – سورية خلال الفترة بين ١٩ –٢٤ حزيران ٢٠١٠.

تم اختيار ودعم مشاركة ١٨ فني، مهندس زراعي، باحث مساعد، مساعد محاضر، وباحث في مجال التقانات الحيوية من البلدان المشاركة في المشروع.

شمل برنامج التدريب محاضرات نظرية وعملية عن طرائق الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والتقدير النوعي والكمي باستخدام الـ بي س ر التقليدي والـ بي س س بالزمن الحقيقي.

تم إعداد هذا المرجع المخبري للكشف عن المواد المعدلة وراثياً بكلا اللغتين العربية والانكليزية خلال الدورة التدريبية. وهو يشمل جمع واعداد وتقديم معلومات عامة شاملة عن المواد المعدلة وراثياً والبروتوكولات والطرائق الخاصة للكشف عن المواد المعدلة وراثياً، كلها مسندة من مراجع علمية متخصصة.

يخدم هذا المرجع كدليل أساسي نظري وعملي في الكشف عن المواد المعدلة وراثياً للمعنيين في البلدان العربية، حيث يعتبر الأول من نوعه باللغة العربية.

يمكن أن يكون هذا الدليل أيضاً مرجعاً للكشف عن المواد المعدلة وراثياً يساهم في تقوية وتعزيز قدرات الهيئات التشريعية الحكومية والمعاهد ووزارات الزراعة والمخابر المخصصة للكشف عن المواد المعدلة وراثياً في الدول العربية، كما وسيمكن من إنشاء نظام تعاون إقليمي واتصالات مستدامة بين المعنيين في الدول المختلفة في الكشف عن المواد المعدلة وراثياً.

كما ويساهم هذا المرجع بمساعدة البلدان العربية في تطبيق قوانين الأمان الحيوي الوطنية تحت مظلة اتفاقية التنوع الحيوي، حيث يعتبر الكشف عن المواد المعدلة وراثياً المفتاح الأساس وشرط رئيسي لتنفيذ ومراقبة تشريعات وقوانين الأمان الحيوي.

١٩ حزيران ٢٠١٠

المؤلفون

الجـــزء الأول

المبادئ النظرية حول
الكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً والأمان الحيوي

١.١. مقـــدمـة

يبقى نشر التقنيات الزراعية التي تعزز وتزيد الانتاجية دون الاضرار بالمصادر الطبيعية التحدي الأكبر للأجيال. ومع ذلك، فان الاتجاهات الحالية تدل على أن التكنولوجيا وخصوصاً التقانات الحيوية اذا استخدمت بالشكل المناسب، فانها توفر طريقة مسؤولة لتعزيز غلة المحاصيل الزراعية الان وفي المستقبل.

توفر وسائل التقانات الحيوية امكانية عزل ومعالجة ونقل المورثات بين الأنواع النباتية وتوسع مجمع البنك الوراثي المتاح ويمكن أن تستخدم لاجراء تعديل وتحسين وراثي للنباتات والحيوانات والأحياء الدقيقة.

وقد أقرت منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (فاو) بامكانية الهندسة الوراثية على المساعدة في زيادة الإنتاج والإنتاجية في الزراعة والغابات والأسماك من خلال رفع مستويات الغلة في الأراضي الهامشية في الدول النامية وتحسين نوعية المواد الخام في الرز الغني بطليعة فيتامين أ وبالحديد أوتحسين تحمل الأصناف الجديدة من المحاصيل الزراعية للاجهادات الحيوية واللاحيوية المتنوعة.

تتميز الهندسة الوراثية بامكانيات هائلة للمساعدة في زيادة الانتاج والانتاجية في الزراعة والغابات والأسماك، على سبيل المثال، من خلال زيادة مستويات الغلة في الأراضي الهامشية في الدول النامية، وتحسين نوعية المواد الخام في طليعة الفيتامين أ والرز الغني بالحديد، أو تحسين تحمل الاجهادات الحيوية واللاحيوية بالاصناف الجديدة من المحاصيل الزراعية. ولكن وفي الوقت نفسه،

من جهة أخرى، وعلى الرغم من فوائدها العديدة، فان الكائنات المعدلة وراثياً ذات أخطار محتملة تترافق معها وهي في كثير من الأحيان مشحونة بالانفعالات والعواطف. والتي يمكن تصنيفها في مجموعتين رئيسيتين هما: التأثيرات المحتملة على صحة الانسان والحيوان وتأثيرات على البيئة. أغلبية هذه المخاطر المحتملة هي مشتركة في كل الدول والمجتمعات.

ولذلك وبغية ضمان الاستخدام الآمن وتطوير التكنولوجيا الوراثية ولمنع أية أضرار محتملة لصحة الإنسان والحيوان والبيئة والتي يمكن أن تنشأ من استخدام الكائنات المعدلة وراثياً، فانه يتم تحليل وتقييم أخطار كل نبات أو حيوان أو عضوية جديدة معدلة وراثياً كل حالة على حدا.

على المستوى التقني، أثارت التطورات المضطردة للكائنات المعدلة وراثياً مجموعة من التساؤلات حول إطلاق هذه الكائنات المعدلة وراثياً في البيئة وتحديد اثارها والبحث في التأثيرات السلبية المحتملة على سلامة المستهلك والبيئة. كما أبرزت الزيادة الكبيرة في المساحات المزروعة بالنباتات المعدلة وراثياً، والتي بلغت ١.٦ مليون هكتار في عام ١٩٩٦ لتصل الى ١٤٨ مليون هكتار في ٢٠١٠ مزروعة في ٢٩ دولة،

الحاجة لتطوير طرائق قياسية سريعة وموثقة لكشف النباتات والبذور المعدلة وراثياً لتساعد في اختبار ومراقبة التعديل الوراثي الذي يجري في على المستوى العالمي. ويوجد العديد من الطرائق التي يمكن تطبيقها لتحديد نوع الكائنات المعدلة وراثياً. وان وجود طرائق لتحديد نوع الكائنات المعدلة وراثياً ضروري ومطلوب من أجل الالتزام بتنظيمات وقوانين الأمان الحيوي.

بالنسبة للدول النامية، يعتبر تعزيز وتنمية القدرات في مجال الكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً ذو أولوية عالية، نظراً لأنه يمهد الطريق لتقوية قدرات المخابر الحكومية المخصصة للكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً وضبط ومراقبة تداولها ومنح التراخيص الضرورية، وأيضاً تسهيل تأسيس قاعدة للكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً الموجودة على مستوى المخابر الوطنية التي سوف تخدم في المستقبل كمركز لتبادل المعلومات والخبرات والخبراء وتعالج احتياجات بناء قدرات معينة في مجال الكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً في المنطقة حسب الحاجة.

١.٢. مقـــدمـة في الهندســـة الوراثيـــة للمحاصيـل

١.٢.١. مصطلحات علمية:

هناك مجموعة من المصطلحات المستخدمة في هذا المجال من البحوث، ولذلك لا بد من توضيح بعض هذه المصطلحات هنا:

- **الهندسة الوراثية:** تعديل التركيب الوراثي، وبالتالي الشكل الظاهري بواسطة **التحوير الوراثي**
- **التحوير الوراثي:** نقل واندماج دنا إلى خلية ما، حيث تكتسب الخلايا المحورة وراثياً شكل/ نمط ظاهري جديد حسب هذا الـ دنا المنقول إليها.
- **العضويات المهندسة وراثياً:** الفرد أو العضوية التي تم تحويرها بنجاح وتحتوي على مورثة أو مورثات جديدة في تركيبها الوراثي (جينومها/مجينها) وبحيث تصبح ثابتة مما يسمح بتوريثها للأجيال المتعاقبة /النسل. وهذه تسمى متحورات وراثية.
- **المورث المنقول** Transgene تسلسل دنا لمورث معروف تم نقله بالتحوير الوراثي للكائن المستقبل.
- **الناقل** Vector جزيء دنا صغير (بلاسميد، فيروس، بكتريا أو جزيء دنا مقطوع أو مصنع) يمكن استخدامه لتوصيل دنا إلى داخل الخلية المراد تحويرها. ويجب أن يكون الناقل قادراً على التضاعف وأن يحتوي على موقع استنساخ/ تنسيل لإدخال الـ دنا الغريب فيه. كما يوصف الناقل أيضا لوصف العوامل الفيزيائية والبيولوجية (حشرات،...) والتي تحمل وتنقل الأمراض.

١.٢.٢. الهندسة الوراثية في النباتات.

١.٢.٢. ١. ماذا تحتاج لتحوير كائن ما وراثياً؟

١. **المضيف:** العضوية التي ستستقبل الـ دنا الجديد والمراد تحويرها وراثياً.
٢. **الدنا:** أي الـ دنا المراد نقله إلى المضيف.

يجب أن يكون المضيف مؤهلاً للتحوير الوراثي، أي أن يكون قادراً على امتصاص الـ دنا. البكتريا التي استخدمها العالم غريفث كانت مؤهلة طبيعياً لامتصاص الـ دنا. بينما الايشيرشيا كولاي عموماً ليست مسعفة أو مساعدة جداً، حيث لا بد من إجراء عدد من المعاملات لجعل تلك الخلايا مؤهلة لامتصاص الـ دنا. إحدى هذه المعاملات هي معاملة البكتريا بكلوريد الكالسيوم المثلج وليس معروفاً تماماً ماذا تعمل

هذه المعاملة للبكتريا، لكنه يفترض أن الحواجز الفيزيائية لدخول الـ دنا إلى البكتريا والجدار والغشاء الخلوي تصبح أكثر قابلية للتخلل مما يسمح بدخول الـ دنا إلى الخلية.

تمزج خلايا الايشيرشيا كولاي المؤهلة والـ دنا مع بعض في أنبوب اختبار. وبعد بضعة دقائق، تعرض البكتريا لفترة وجيزة للحرارة (صدمة حرارية) ثم تنمى على وسط أغار. لكن، هل كل البكتريا تصبح محورة؟ لا، حيث أن أعلى نسبة تحوير للايشرشيا كولاي هي 1% فقط، أي أن خلية بكتيرية واحدة فقط تتحور من أصل 100 خلية. وعموماً، في كل طرائق التحوير الوراثي، فان تكرارية (نسبة التحوير)، أي نسبة الخلايا التي امتصت الـ دنا الجديد هي قليلة (بالنسبة للايشيرشيا كولاي عادة يستخدم 0.1 ميكروغرام دنا)، أي بالمتوسط، فقط جزيء واحد من كل 10000 جزيء يتحور بنجاح في المضيف). وهكذا فان المشكلة العملية الرئيسية هي كيف تحدد الخلايا المحورة النادرة نسبياً من بين هذا العدد الهائل من البكتريا غير المحورة.

كيف يمكن تعريف البكتريا المحورة؟ المتحورات يجب أن تكون مميزة عن غيرها. الـ دنا الذي امتصته البكتريا يجب أن يحمل مورثة تعطي البكتريا المحورة صفة مميزة أو نمط ظاهري مميز، والذي يمكن أن تميز بها البكتريا المحورة عن غير المحورة. في تحوير البكتريا، الـ دنا المستخدم للتحوير يحمل مورثة مقاومة لأحد المضادات الحيوية، مثل: أمبيسيلين أو تتراسايكلين. فالبكتريا التي تحورت بالـ دنا سوف تكون قادرة على النمو بوجود المضاد الحيوي، بينما البكتريا غير المحورة (وهي الأغلبية العظمى) لن تنمو.

بعد مزج البكتريا مع الـ دنا، توضع البكتريا على وسط يحوي مضاد حيوي، حيث يسمح فقط للبكتريا المحورة أن تنمو. مورثة المقاومة للمضاد الحيوي هذه تسمى أيضاً معلمة انتخاب selectable marker لأنها تتيح الانتخاب والتحديد المباشر للبكتريا المحورة. مورثات معلمات الانتخاب أساسية للتحوير الوراثي لكل العضويات، نظراً لأن نسبة التحوير الوراثي قليلة جداً. يتيح التحوير باستخدام النواقل التي تحمل مورثة معلمة انتخاب التعريف بشكل مبسط للعضوية المحورة.

يمكن تلخيص التحوير الوراثي للبكتريا كما يلي:

- مزج الـ دنا (الناقل) مع خلايا البكتريا القادرة على امتصاص الـ دنا.
- معاملة المزيج (صدمة حرارية مثلا أو معاملة كهربائية /ثقب كهربائي، الكتروبوريشين) للسماح للـ دنا بدخول خلايا المضيف.
- تنمية خلايا المضيف

- تعريف الخلايا المحورة (تنمية على وسط يحوي مضاد حيوي)

يجب أن يحوي الـ دنا المستخدم في تحوير البكتريا مورثة معلمة للانتخاب مثل مورثة مقاومة لأحد المضادات الحيوية ومنطقة للتضاعف، فإذا لم يتضاعف الـ دنا المدخل إلى البكتريا عندما تنقسم البكتريا، عندئذ الدنا المنقول إلى هذه الخلايا سوف لن يكون موجوداً في كل النسل، وبالتالي سوف يفقد بسرعة. ولذلك، هذين المكونين أساسيان في الـ دنا المستخدم للتحوير. لكن ليس الهدف من تحوير الايشرشيا كولاي هو ببساطة إدخال نسخة من أجزاء الـ دنا هذا، إنما أيضاً نقل مورثات أخرى مرغوبة إلى العضوية المضيف. هذه المكونات الأساسية تجمع في الناقل الذي يستخدم لنقل أجزاء دنا أخرى إلى البكتريا. بنفس الطريقة التي تحمل فيها النواقل المسببة للأمراض بين العضويات، فان نواقل التحوير تحمل الـ دنا إلى المضيف.

معظم نواقل التحوير هي بلاسميدات، وهي عبارة عن جزيء دنا دائري يحمل هذه المكونات الأساسية ويمكن أيضاً أن يملك دنا أخر مضاف إليه.

كيف تضاف أجزاء أخرى من الـ دنا إلى البلاسميد الناقل؟ الناقل يجب أن يحتوي موقع حيث جزيء الـ دنا الدائري يمكن أن يقطع بالأنزيمات المحددة / المقيدة RE لقص هذا الجزيء، ومن ثم يمكن إدخال أجزاء دنا أخرى إلى الناقل باستخدام أنزيم ربط الـ دنا (دنا ليجيز) لربط جزيئات الـ دنا وإيجاد بلاسميد دنا دائري جديد. جزيئات الدنا المأشوب هذه تشكل في أنبوب اختبار، ومن ثم تنقل إلى الايشيرشيا كولاي بالتحوير الوراثي.

لاحظ أن النواقل البلاسميدية هي عادة جزئيات دنا صغيرة، الكثير منها بحجم فقط حوالي 3000 شفع نيوكليوتيدي (زوج قاعدي). هناك العديد من الأسباب لهذا، وهي: تحوير الايشرشيا كولاي أسهل بجزيئات دنا صغيرة، وكلما زاد حجم جزيء الـ دنا، فان احتمال وجود موقع وحيد لأي أنزيم قطع في الناقل يقل، فإذا قطع الناقل إلى قطعتين، فانه ليس مرجحاً أنهما سوف يلتحمان مع بعض بالطريقة الصحيحة بعملية ربط الدنا.

نواقل التحوير الوراثي للايشرشيا كولاي حالياً متطورة جداً، وتم إضافة خواص جديدة لها تتيح استنساخ أجزاء الـ دنا بشكل سهل. على سبيل المثال، عندما تربط مع بعض دنا الناقل وأجزاء أخرى من الـ دنا، فانك تخلق عدداً من التراكيب المختلفة. كباحث، أنت تهتم فقط بتلك التي تجمع الناقل مع دنا أخر، لكن الناقل يمكن ببساطة أن يعود ويلتحم مع نفسه لإنتاج جزيء دنا والذي سوف يحور البكتريا ويعطي مستعمرات مقاومة للمضاد الحيوي.

كيف يمكن التمييز بين البكتريا التي تحورت بالبلاسميد المأشوب وتلك التي أعيد التحامها مع نفسها والتي لا تحوي جزء الـ دنا الجديد؟

في نواقل كثيرة، تحوي النواقل مورثة ثانية (المورثة الزرقاء) والتي عندما يتم التعبير عنها، فان البكتريا تصبح زرقاء بدل أن تبقى بيضاء عندما تنمى على وسط دليل خاص. موقع استنساخ أجزاء الـ دنا هو في منتصف هذه المورثة الزرقاء، فعندما يدخل جزيء الـ دنا في هذا الموقع، فان المورثة الزرقاء تفسد وتصبح غير فعالة. البكتريا التي تمتص جزيء الدنا المأشوب هذا لا تزال مقاومة للمضاد الحيوي، لكنها ستكون بيضاء الآن بدل أن تكون زرقاء. أي أن المستعمرات الزرقاء تحوي فقط الناقل الملتحم مع نفسه، بينما المستعمرات البيضاء تحتوي بلاسميدات الـ دنا المأشوب.

تمت معالجة هذه البلاسميدات بحيث يخدم بلاسميد واحد وظائف عديدة. وقد أدخلت مواقع كثيرة للقطع بالأنزيمات المحددةالى النواقل بحيث يمكن استنساخ أجزاء دنا تحوي أنواع مختلفة من النهايات اللصوقة STICKY ENDS والتي تنتج باستخدام أنزيمات القطع المختلفة إلى ناقل ما. الناقل يمكن أيضاً أن يستخدم بحيث يتيح تعريف وبشكل سهل تماماً تسلسل الـ دنا لجزء الـ دنا المستنسخ (المستنسل). الـ رنا عندئذ يمكن أن ينسخ من الـ دنا الذي استنسل في الناقل، والذي يمكن أن يكون مفيداً لأغراض بحثية عديدة.

تعتمد معظم طرائق التحوير الوراثي المستخدمة لحقيقيات النوى الراقية على إدخال الـ دنا الذي تم نقله إلى كروموزوم. فعندما يندمج الـ دنا إلى الكروموزوم فانه سوف ينقل من خلال الانقسام الميتوزي والانقسام الميوزي المنصف بشكل أكيد، ويتم توارثه بشكل ثابت إلى الأجيال المتعاقبة.

تقسم **طرائق التحوير الوراثي** إلى مجموعتين:

الأولى تستخدم وسائل فيزيائية لإدخال الـ دنا إلى الخلية، مثل طريقة تحوير الخميرة أو الايشيرشيا كولاي التي سبق وصفها قبل قليل باستخدام كلوريد الكالسيوم، أو معاملات كيميائية أخرى لجعل الخلايا مؤهلة لامتصاص الـ دنا.

والثانية تستخدم عوامل بيولوجية مثل البكتريا أو الفيروسات كنواقل لنقل الـ دنا.

لكن مهما تكن الطريقة المستخدمة، فانه يجب أن يجتاز الـ دنا عدداً من الحواجز الفيزيائية لكي يكون التحوير ناجحاً. تشمل هذه الحواجز الجدار الخلوي، الغشاء البلازمي، محتويات السيتوبلازم والغشاء النووي والذي يؤدي في نهاية المطاف إلى الاندماج في الكروموزوم.

١.٢.٢. ٢. خطوات التحوير الوراثي للنباتات

عموماً، كل طرائق التحوير الوراثي للنباتات تتبع الطريقة العامة الموصوفة أدناه:

١. تزال عينات الأنسجة من النبات المراد تحويره، هذه العينات تعرف بالمستزرعات وتؤخذ من أنسجة نباتية متنوعة. المصدر الأخر للمادة النباتية للتحوير الوراثي هو زراعات الأنسجة النباتية حيث تكون الخلايا نامية بشكل معقم. وتجري الخطوات التالية تحت شروط زراعات الأنسجة المعقمة حيث تنمى الأنسجة النباتية على وسط أغار مزود بالعناصر الغذائية الكبرى والصغرى التي يحتاجها النبات للنمو مع فيتامينات ومنظمات نمو مختلفة.

٢. يخضع المستزرع لإجراءات التحوير الوراثي. الهدف هو تحوير أكبر عدد ممكن من الخلايا. هنا يوجد نقطتين هامتين يجب تذكرهما هنا هما: معظم إجراءات التحوير غير فعالة وفقط جزء صغير من الخلايا المستهدفة تتحور فعلاً. والنقطة الثانية هي أن كل خلية تتحور هي فريدة. فعلى الرغم من أن كل الخلايا ربما استقبلت نفس قطعة الدنا، لكن الموقع الذي تندمج به في الكروموزوم مختلف في كل خلية وهذا يعني أن كل خلية محورة هي مختلفة وراثياً.

٣. يطبق الانتخاب لتحديد الخلايا النادرة التي تحورت. فقط الخلايا المحورة ستكون قادرة على النمو تحت هذه الشروط. بدون هذا الانتخاب، تتجدد نباتات كثيرة ولاحقاً تغربل للبحث عن النبات النادر المحور.

٤. يغير تركيب وسط النمو وخصوصاً مستويات الأوكسين والسيتوكينين بحيث تتجدد الأنسجة المتمايزة من الخلايا المحورة.

٥. تجمع البذور من النباتات المتجددة المحورة ويختبر النسل من حيث توارث المورثة المنقولة.

٦. يدرس النمط الظاهري للنباتات المهندسة وراثياً لتحديد ما إذا المورثة المنقولة قد غيرت أداء النبات وأضفت عليه صفة المورثة المنقولة.

١.٢.٢. ٣. طرائق التحوير الوراثي للنبات. تشمل **طرائق نقل الدنا** (DNA) الآتي:

- **الطرائق المباشرة:** وتشمل:

قذف المورثات بالمدفع البيولوجي Gene gun: حيث يتم استخدام بندقية خاصة تدعى بالمدفع ذي القذيفة الدقيقة ورصاصات مصنوعة من التنغستاين أو الذهب قطرها ١ ميكروميتر وتحمل المورثات المطلوب إدخالها للخلية النباتية.

الحقن المجهري الدقيق Microinjection: ويحتاج الأمر إلى ميكروسكوب وماصة وإبرة دقيقة ويؤخذ منها جزء من الـ DNA أو كروموزرم بالكامل، ثم يتم الحقن إلى داخل الخلية أو إلى البروتوبلاست (خلية بدون جدار خلوي).

طريقة الثقب الكهربائي Electroporation: في هذه الطريقة تستخدم نبضات عالية الفولتية لإحداث ثقوب سريعة الزوال في غشاء الخلايا العارية لكي تمر جزيئات الـ DNA من خلالها إلى الكائن الحي الجديد المراد نقلها إليه.

استخدام البولي ايتيلين غليكول PEG وتسمى هذه الطريقة أيضاً إدخال الـ DNA الحر في الخلايا العارية للنباتات (البروتوبلاست) لأن الثقوب في جدر الخلايا أصغر من أن تسمح للـ DNA بأن يمر بسهولة، بينما في الخلايا العارية فالحاجز الوحيد هو الغشاء البلازمي لينقل الـ DNA، وهذا البوليمرهو أكثر عوامل النقل الكيميائية شيوعاً.

وتتميز هذه الطرائق بأنها: تتطلب تجهيزات غالية الثمن، صعبة التعامل والتداول وتتطلب عملاً مكثفاً، ليست نموذج وراثي طبيعي، ليست قابلة لإعادة الإنتاج، كما أنها أقل كفاءة من طريقة التحوير بواسطة الأغروباكتيريا.

- **الطرائق غير المباشرة:**

وتتضمن استخدام **الأغروباكتريا** (*Agrobacterium tumefaciens* & *A. rhizogenesis*)

إذ تسبب هذه البكتريا مرض التدرن التاجي الذي يصيب العديد من النباتات ثنائية الفلقة، وتدخل عن طريق الجروح في جذورها وتترك الـ Ti-plasmid (تي بلاسميد) الخاص بها داخل النبات، ويوجد جزء من هذا البلاسميد يسمى T-DNA يتحكم في الخلية وراثياً، ويؤدي إلى سرعة انقسامها وتكاثرها بطريقة يصعب التحكم فيها، وبالتالي يؤدي إلى حدوث أورام بجذور النبات، وفي نفس الوقت فان هذا الورم يفرز مادة كيماوية تتغذى عليها البكتريا. ومن هذا المنطلق أصبح الـ Ti-plasmid هاماً بالنسبة للتقانات الحيوية الحديثة لمقدرته على الدخول والاندماج في كروموزوم النبات وذلك بعد تجريده من مورثات تخليق الأورام.

١.٢.٢. ٣. ١. التحوير بوساطة بكتريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens*

اعتمدت أول طريقة موثقة للتحوير الوراثي للنبات على المسبب المرضي الذي يصيب النباتات وخصوصاً العنب والزيتون ويسبب مرض التدرن التاجي وهو الأغروباكتريا. والأغروباكتيريا هي بكتيريا سالبة الغرام تعيش في التربة وتعدي بشكل طبيعي الكثير من النباتات ثنائية الفلقة. تسبب العدوى بالأغروباكتيريا تحريض نموات ورمية عند مواقع العدوى تسمى التدرنات التاجية. تنتج استجابة النمو هذه عند حدوث هندسة وراثية طبيعية يتم فيها نقل جزء صغير من الـ DNA هو T-DNA من البلاسميد المحرض للأورام Ti-Plasmid بالأغروباكتيريا إلى الخلية النباتية. يدخل هذا الـ T-DNA بالمنطقة الخبيثة وهي تحمل مورثات تسمى Vir genes هي المسؤولة عن تخليق الأورام وتهيئة الخلايا أثناء العدوى، وهي توجد في منطقة الـ T-DNA Hooyakaas and (Beijersbergen, 1994). إن تنشيط الـ Vir genes في البكتيريا ربما يكون ضرورياً من أجل تهيئة الخلايا النباتية للعدوى ومن أجل النقل اللاحق للـ T- DNA، أما الـ T- DNA نفسه فيحوي مورثات يشار لها بـ Oncogenes وهي مسؤولة عن تخليق الأورام. ويجب أن تدخل المورثات المرغوبة إلى الخلايا النباتية بين الحدين اليميني واليساري للـ T- DNA. ويمكن معرفة النسيج المحور بواسطة الأغروباكتيريا الطبيعي (غير المهندس وراثياً) بالنمو الورمي المميز والذي يتكاثر بشكل سريع على أوساط خالية من الهرمون بسبب تغيير التوازن الهرموني. لكن، من جهة ثانية، يكون التلاعب الوراثي النباتي بالبلاسميد المحرض للأورام ذو قيمة محدودة إذا كانت الخلايا النباتية المحورة الناتجة ورمية وغير قادرة على التجدد إلى نباتات خصبة طبيعية. لذلك فإنه ضروري جداً استبعاد الخواص الورمية التي تثبط التمايز الطبيعي للخلايا النباتية من الـ T- DNA. إن ما يدعى Disarmed Ti-Plasmid أو البلاسميد المجرد أو المنزوع السلاح هو البلاسميد الذي أزيلت منه الـ Oncogenes أي المورثات المسببة للأورام من T-DNA الخاص به ولكنه يحتفظ بالمناطق الحدودية. هذه البلاسميدات المجردة السلاح تحتفظ بالقدرة على نقل الـ T-DNA إلى صبغيات النبات، لكنها أيضاً تتيح تجديد نباتات سليمة. بعدئذ يمكن تحديد النباتات المتجددة من النسيج المحور بواسطة البلاسميد منزوع السلاح والمحتوي على مورثات تصنيع الأوبين. والطريقة الأكثر فعالية والمستخدمة لتعريف خلايا النبات المحورة تتم بإضافة مورثة نباتية موسومة (معلمة) مع الـ T- DNA، مثلاً المورثة التي تضفي المقاومة للمضادات الحيوية مثل الكانامايسين، أو مورثة المقاومة للمبيدات العشبية. ففي هذه الحالة، فقط الخلايا المحورة تستطيع النمو على الوسط المحتوي على العامل الانتخابي (الكانامايسين أوالأمونيوم غلوفوسينات مثلاً)، بينما لا تستطيع الخلايا غير المحورة النمو على هذا الوسط. عملياً، بعد تركيب

الناقل وتطعيمه بالمورثة المرغوبة تجري عملية نقله إلى خلايا الأغروباكتيريا بطرائق عديدة منها: طريقة التزاوج ثلاثية الآباء Triparental Mating أو بالصدمة الكهربائية أو بطريقة تسمى الثقب الكهربائي Electroporation، حيث يتم وضع المورثة المرغوبة مع سلالة الأغروباكتيريا معاً في حجرة خاصة ويتم تعريضهما لصدمة كهربائية لمدة ثواني معدودة، وبالتالي يتم إحداث ثقوب في الأغروباكتيريا تدخل من خلالها المورثة (أي الـ DNA) إلى خلايا الأغروباكتيريا. ويتم التأكد من ذلك قبل البدء بإجراء عمليات التحوير الوراثي للنبات حيث تستخدم تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز الـ PCR (Polymerase Chain Reaction) لتضخيم جزء محدد من الـ DNA أضعاف مضاعفة، ثم يتم فصل الـ DNA حسب حجمه عبر هلام أغاروز باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي Electrophoresis، ثم توضع الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية بعد أن تصبغ بمادة الإيثيديوم بروميد ليتم كشف الـ DNA الغريب وتحديد حجمه، حيث أنه عادةً يتم وضع DNA معلوم الحجم (DNA marker) أيضاً في الهلامة في حفرة الى جانب العينات المختبرة، وبالتالي فإنه باعتبار أن حجم الـ DNA المرغوب معروف ومن ثم يمكن مقارنة حجم الـ DNA المنقول مع حجم الـ DNAمعلوم الحجم. وبعد ذلك، (أي بعد نقل الـ DNA المرغوب إلى سلالة الأغروباكتيريا والتي تستطيع أن تعدي النبات الذي نريد نقل المورثة إليه)، تجرى عملية الزراعة المشتركة لخلايا النبات مع الأغروباكتيريا المحتوي على المورثة المرغوبة وذلك لمدة ٣ أيام تقريباً حيث يتم خلالها انتقال الـ DNA من الأغروباكتيريا إلى خلايا النبات، ثم يتم غسل خلايا النبات بقاتل للبكتيريا لكي نتخلص من البكتيريا، ثم تزرع خلايا النبات على أوساط تحوي مضاد حيوي انتخابي ويحوي هرمونات نباتية من أجل تجديد نبات كامل من هذه الخلايا، وهذا يعتبر ذو أهمية رئيسية في تطوير نظام زراعة الخلايا من أجل الاستخدام في الزراعة المشتركة، أي القدرة على تجديد نباتات من المادة المزروعة المحورة وراثياً، حيث إن ما هو ذو أهمية رئيسية في تطوير نظام زراعة الخلايا من أجل الاستخدام في الزراعة المشتركة هو القدرة على تجديد نباتات من المادة المزروعة.

وعموماً هناك طريقتان شائعتان للاستخدام من أجل الزراعة المشتركة مع الأغروباكتيريا هما:

- **البروتوبلاست القابلة للتجديد**: البروتوبلاست بالتعريف هي خلايا مفردة أزيل عنها الجدار الخلوي بواسطة الهضم الأنزيمي، لهذا السبب فإن البروتوبلاست هي في حالة إصلاح (ترميم) الجرح مما يجعلها حساسة للعدوى بالأغروباكتيريا. وهنا يمكن معاملة أعداد كبيرة من البروتوبلاست في كل زراعة مشتركة وهذا يجعل اكتشاف أحداث التحوير ذات التكرار الضعيف ممكناً. بالإضافة إلى ذلك،

هذه المادة تتعرض بشكل متماثل للعامل الانتخابي مما يؤدي إلى نجاة أقل (أي نمو أقل للخلايا غير المتحورة)، وبالتالي تكون أحداث التحوير المفردة أكثر سهولة للتعريف.

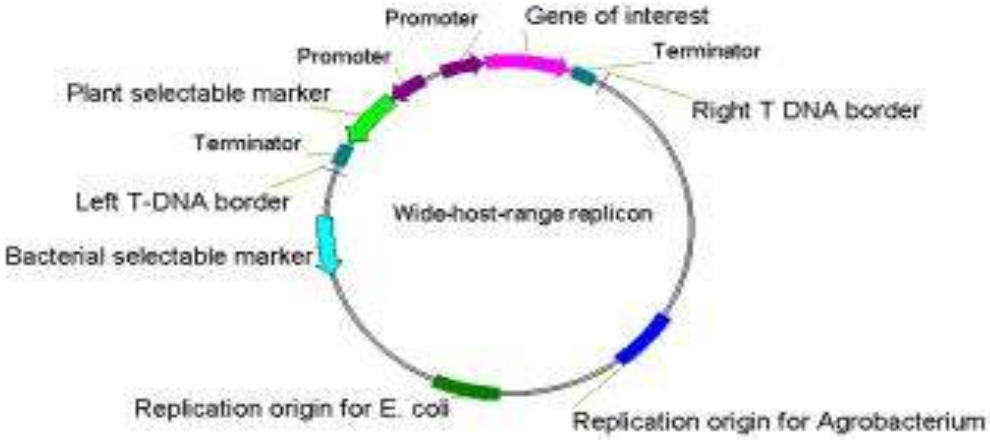
- **طريقة الزراعة المشتركة والتجديد** وهي استخدام مادة نباتية قابلة للتجدد مستأصلة من زراعات الأنسجة من أجل الزراعة المشتركة مع الأغروباكتيريا، وقد ثبتت فعالية هذه الطريقة في أنواع عديدة. وهي تتميز بميزتين رئيسيتين هما:

أ- يمكن أن تستخدم في الأنواع التي لا يوجد لها تقنيات زراعة بروتوبلاست قابلة للتجدد.

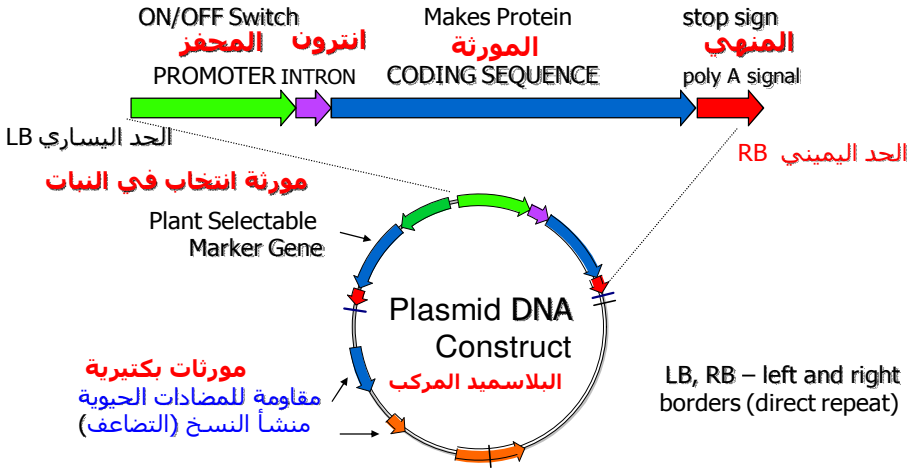
ب- الأقراص الورقية أو مواد المستزرعات الأخرى التي تستطيع أن تجدد نباتات بسرعة أكبر من طريقة البروتوبلاست. والمبدأ المتبع هو نقل جزء من DNA الأغروباكتيريا هو T-DNA من البلاسميد المحرض للأورام حيث يتم نقل المورثات المرغوب إدخالها للخلية النباتية إلى هذا الجزء وبالتالي يقوم الـ T-DNA بتسليم هذه المورثات إلى الخلية النباتية للقيام بالوظيفة المخصصة لهذه المورثات بدلاً من مورثات الأغروباكتيريا التي تقوم بحث الخلية النباتية على إنتاج مواد خاصة لمصلحة الأغروباكتيريا مثل إندول حمض الخل وزياتين رايبوزايد التي تؤدي إلى إحداث نموات ورمية في الخلايا النباتية. ومن الهام والضروري بأن تتمتع الخلايا النباتية بعد التحوير الوراثي بميزة التجدد إلى نباتات خصبة طبيعية، ويمكن تحديد نجاح التحوير الوراثي باستخدام طريقة الرحلان الكهربائي

(Perani *et al.* 1986; Shah *et al.* 1988;Hooyakaas and Beijersbergen 1994; Gartland 1995).

وبالإضافة إلى المورثة المرغوبة المراد نقلها إلى النبات المحور، فإن مورثات أخرى ضرورية للتحوير الوراثي أيضاً تنقل بما فيها المورثات المعلمة التي تتيح انتخاب الخلايا المحورة. من بين مورثات الانتخاب الشائعة الاستخدام: مورثة نيومايسين فوسفوترانسفيراز *(npt II)* التي تضفي المقاومة للمضادات الحيوية أمينوغلوكوزايد (مثل الكانامايسين وغيره)، ومورثة المقاومة لمبيدات الأعشاب فوسفينوثريسين (Miki & Mchugh. 2004). لكن من جهة ثانية، ونظراً لشكوك العامة المتعلقة بدخول مورثات المقاومة للمضادات الحيوية في السلسلة الغذائية، فإن هناك اتجاه نحو تطوير طرائق لاستبعاد مثل هذه المورثات من النباتات أو تجنب انتخاب الخلايا باستخدام المضادات الحيوية Hohn *et al.* (Zuo *et al.* 2002; 2001).



شكل يبين أجزاء/ مكونات الـ تي بلاسميد في الأغروباكتريا



شكل يبين أجزاء/ مكونات البلاسميد المركب (الماشوب)

(Zhu 2000; Adrian *et al.* 2003; Barnum 1998; Chawla 2004; Nicholl 2002; Phillip 1998 a,b,c ; Zaid 2001)

كيف يمكن تحوير النباتات وراثيا دون المرور باجراءات زراعة الأنسجة هذه كلها والتي هي ناجحة في بعض الأنواع وأيضاً تدخل بشكل عرضي تغيرات غير مرغوبة؟

ان الأسئلة المثارة هذه وغيرها كانت وراء تطوير طريقة التحوير الوراثي للنباتات باستخدام مدفع قصف المورثات وهذا ما نتناوله الان.

١.٢.٢. ٣. ٢. التحوير باستخدام مدفع الجينات

١.٢.٢. ٣. ٢ . ١. خلفية نظرية: تم إيجاد المدفع الجيني كطريقة جديدة للتقدم بالتحوير الوراثي للنجيليات بسبب صعوبة دخول البكتريا إلى الجدار الخلوي للحبوب. لقد صممه جون سانفورد في جامعة كورنيل في الولايات المتحدة عام ١٩٨٧ والذي جعل إدخال المادة الوراثية إلى خلايا النبات أسهل بكثير من الطرائق السابقة كاستخدام الفيروسات أو الأغروباكتريا. للمدفع الجيني مجال واسع من الاستخدامات ويمكن استخدامه على عضويات كثيرة مثل البكتريا والخميرة وسلالات الخلايا البشرية، وخصوصاً تلك التي كانت في السابق صعبة أو مستحيل إحداث العدوى بها مثل الخلايا التي لا تنقسم، أو الخلايا الأولية. التحوير لا ينطبق فقط على العضويات وحيدة الخلية، إنما أيضاً على أشياء كاملة: مثل الأوراق أو الحيوانات كاملة (دروسوفيلا والفئران). إنه مفيد بشكل خاص للكلوروبلاست، حيث أنه لا يوجد بكتريا ولا فيروسات تعدي الكلوروبلاست، وهذه الطريقة وفرت وسيلة مناسبة لإدخال دنا غريب إلى الكلوروبلاست.

١.٢.٢. ٣. ٢ . ٢. ما طبيعة الانسجة المستحدمة؟

يمكن استخدام انسجة اي نوع نباتي مرغوب طالما يمكن تجديده كخلايا النباتات (الاقراص الورقية أو الأجنة الغير ناضجة من البدور)، حيث أن امكانية التجديد اعتباراً من خلايا معردة غير محدودة. ويمكن للأجنة الغير ناضجة ان تعطي ابيتات يمكنها ان تتابع نموها بعد قدفها بالمدفع الجيني.

١.٢.٢. ٣. ٢ . ٣. كيف يعمل المدفع الجيني؟

المدفع الجيني هو جزء من طريقة تسمى بيوليستيك biolistic أي القصف أو القذف الحيوي أو البيولوجي، وهو وسيلة لإدخال الـ دنا إلى الخلايا المراد تحويرها باستخدام قذائف دقيقة عالية السرعة (مع ضغط غاز الهليوم) مغطاة بالـ دنا مصنوعة من الذهب أو التنغستين لتخترق الخلايا المستهدفة، وبالتالي تمتص هذه الخلايا الـ دنا الغريب المحمول على هذه القذائف. وتتميز بأنها يمكن استخدامها على أي نسيج، والخلايا ذات الجدران الخلوية، وكذلك الأعضاء الكاملة. وتشمل الطريقة: وضع الـ دنا في جزيئات التنغستينِ أو الذهب وتسريع الجزيئات إلى سرعةِ عالية لتتمكن من اختراق الخلايا والأنسجةِ بضغط غاز الهليوم، ومن ثم يتم إجراء انتخاب وإكثار المستزرعات المحورة كما في التحوير بالاغروباكتريا. ويشمل

الجهاز غرفة قذفِ، أنبوب تسريع الغازَ وحامل دقيق للجزيئات .microcarrier. وتتم العملية كما يلي:

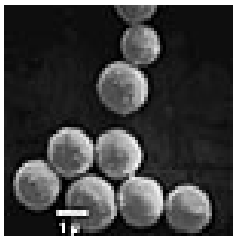
- يفرغ الهواء (٦٦٠-٧٦٠ مليمتر زئبقي) ضمن أنبوب تسريع الغازَ باستخدام مضخة تفريغ.
- يضغط على زرَّ النارَ والذي يَسْمحُ لأنبوب تسريعِ الغازِ لكي يُمْلَأَ بغازِ الهليومِ (الهليوم مُفَضَّلُ على الغازاتِ الأخرى لأنه ينتشر بسرعة أكبر بكثير)، وهذا يعطي سُرَعَة أعلى إلى الحوامل الدقيقة (microcarriers).
- عندما يصل الضغط بين ٤٥٠ - ٢٢٠٠ psi (٣١٠٣ k Pa - ١٥١٦٩) إلى قرصِ التمزيقَ، يَنفجرُ ويُصدر موجة اهتزاز غازِ قويَّةِ. يمر الغاز المنبعث في طريقه بـ microcarrier، الذي يحمل جزيئات الذهب التي تحمل جزيئات الدنا والحاجز السميك.
- وبعد الإطلاق، يَنفْصلُ الـ macrocarrier عن حاملِه بسبب الصدمة وتقذف جزيئات الدنا نحو الهدفَ في أسفل غرفةِ القذف، أي أن جزيئات الذهب التي تحمل الدنا تواصل سيرها وتصل إلى الخلايا النباتية في الأسفل وتخترقها وبالتالي تتم عملية التحوير الوراثي.

وتجدر الإشارة إلى وجود مدفع جيني أحدث يحمل باليد وهو أصغر حجماً، ويمكن أن يستخدم لنقل المورثات وهو أقل تعقيداً.

ومن أهم مزايا استخدام المدفع الجيني، أنه يتيح نقل الدنا إلى أنسجة سليمة كالبذور والأجنة والميرستيم. كما أنه باستخدام جهاز وحيد ونفس البروتوكول يمكن نقل كل المورثات، وبالتالي إمكانية تحوير بدائيات وحقيقيات النوى، وكذلك التحوير النووي وتحوير الكلوروبلاست والميتوكوندريا (الخميرة).

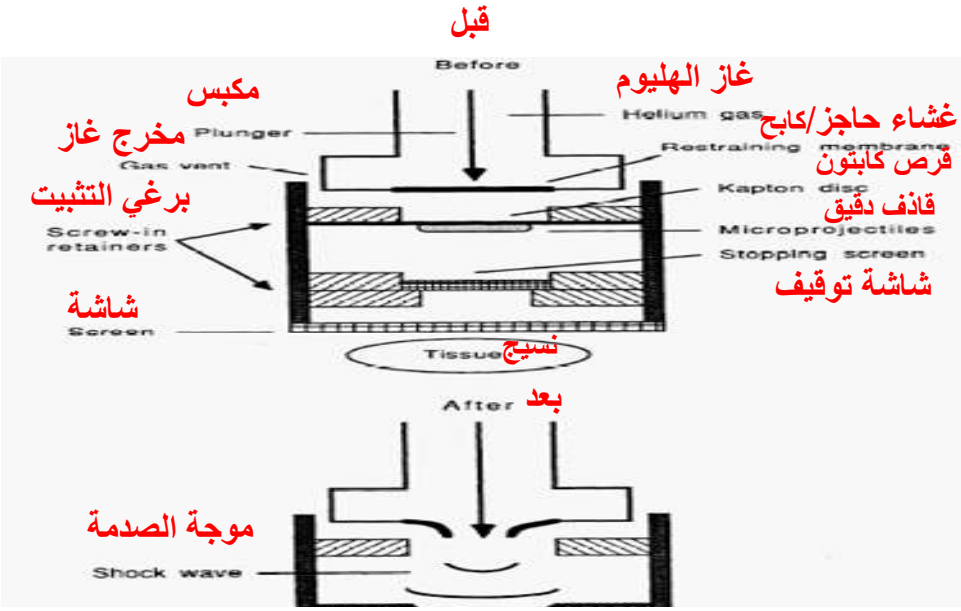
أما سلبيات هذه التقنية، فتتجلى بأن اندماج الدنا الغريب في جينوم المضيف يكون بشكل عشوائي، كما أن نسبة ثبات التحوير منخفضة، والحصول على نسخ مكررة والكلفة العالية.

ومن الأمثلة الناجحة لأنواع تم فيها استخدام المدفع الجيني في التحوير الوراثي نذكر: الأرز والقمح والشوفان والقطن والباباظ والكاسافا والتبغ وفول الصويا والبطاطا والأرابيدوبسيس وغيرها.



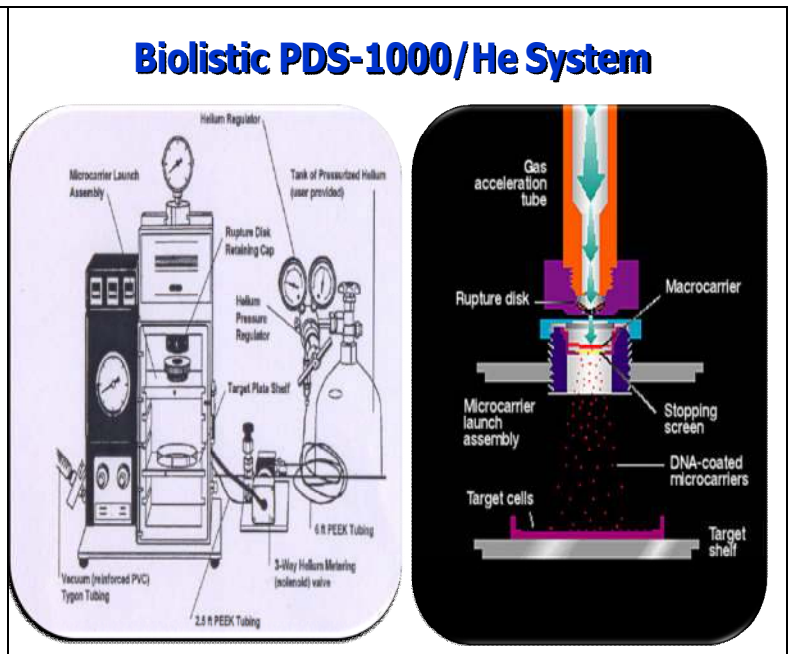
أعلى اليسار: جزيئات الذهب المستخدمة في المدفع الجيني
أعلى اليمين: جزيئات التنغستين المستخدمة في المدفع الجيني

مخطط يبين كيف يعمل المدفع الجيني المزود بقوة الهليوم والذي يمسك باليد وذلك بدفع الجزيئات المغطاة بالدنا الى الأنسجة



أعلى: مخطط كيف يعمل المدفع الجيني المزود بقوة الهليوم والذي يمسك باليد وذلك بدفع الجزيئات المغطاة بالدنا إلى الأنسجة

أسفل: مدفع جيني نظامي



١.٢.٢. ٣. ٢. ٤. تحليل معايير قذف الجزيئات لأمثلة نقل الـ دنا إلى الأنسجة (مثال : القمح)

بغية زيادة كفاءة تسليم الـ دنا بقذف الجزيئات إلى فلقة ونسيج أزهار القمح وتقليل تضرر الأنسجة المستهدفة، تم تقييم المعايير الرئيسية من خلال دراسة التعبير المؤقت للمورثة غلوكورونيديز GUS في الأنسجة التي تم قذفها. من هذه المعايير التي تم تحليلها، كمية الدنا البلاسميدي، تركيز السبيرميدين، وجود أيونات الكالسيوم، تركيز كلوريد الكالسيوم، كمية جزئيات الذهب، حجم جزيئة الذهب، ضغط التسارع، ضغط تفريغ الحجرة، مسافة القذف، الظروف الأسموزية للأنسجة ونوع الأوكسين، والتي كان لها تأثير واضح على التعبير المؤقت للمورثة.

١.٢.٢.٣.٢.٤.١- كمية الـ دنا البلاسميدي: لم يكن هناك تغير كبير في مستويات تعبير المورثة بيتا غلوكورونيديز والناتج من ترسيب ٢.٥ ، ٥، ١٠ أو ٢٠ ميكروغرام دنا على ٢ ملغ جزيئة ذهب، لكن لوحظ انخفاض كبير في تعبير المورث عند تركيز 0.5 µg دنا.

١.٢.٢.٣.٢.٤.٢- معايير ترسيب الـ دنا / الذهب. إن ترسيب الـ دنا على جزيئات الذهب هي الخطوة الأولى في عملية قذف الجزيئات، ونجاح ترسيب الـ دنا هو الذي يحدد الكمية الممكنة من الـ دنا التي ستسلم للأنسجة النباتية. تم تقييم تأثير تغيير المستويات أو تركيز كل مكونات مزيج الترسيب واستكشاف شروط الترسيب المختلفة. تم إثبات معطيات تعبير المورثة GUS بواسطة تجارب تسليم الـ دنا والتي سمحت بتحديد كمية الـ دنا المترسب وغير المترسب.

١.٢.٢. ٣. ٢. ٤. ٣. تركيز كلوريد الكالسيوم وتركيز سبيرميدين. وجد أن كلوريد الكالسيوم مطلب أساسي لترسيب الـ دنا، وبغيابه فقد معظم الـ دنا في الغسيل. وجد أن مجال واسع من تركيز كلوريد الكالسيوم (٠.٢-١.٥ مول) تعطي تركيز *Gus* متماثل، مع كون التركيز الأخفض هو الأمثل. إن الانخفاض في التعبير الملاحظ عند تركيز ٢ مول، يوحي بالتأثير السلبي لتركيز الملح العالي. وأدى غياب الـ سبيرميدين في مستحضر الدنا والذهب إلى ترسيب غير كاف (غير فعال) وفقدان لاحق للـ دنا في الغسيل. وجد أن سبيرميدين بتركيز بين ٨ و١٦ ميلي مول، يعطي تعبير مؤقت مثالي للمورثة، بينما أدى التركيز العالي منه (80 mM) إلى انخفاض تعبير المورثة GUS.

١.٢.٢. ٣. ٢. ٤. ٤ . غليسرول و بولي ايثيل غليكول. لم يؤثر إضافة 0.7% بولي ايثيل غليكول (MW 1500) لا على تعبير المورثة ولا على ترسيب الـ دنا. الغليسرول وبولي ايثيل غليكول استخدما كعوامل ترسيب في تحوير الرز، حيث نشر أن كلاهما يحسن تعبير المورثة GUS، بينما في تحوير القمح، ولا أي من هذين المركبين كان مفيداً لترسيب الـ دنا وتعبير المورثة GUS.

١.٢.٢. ٣. ٢. ٤. ٥ . كمية جزيئات الذهب. تراوحت كمية جزيئات الذهب المطلوبة للتعبير المؤقت المثالي للمورثة من 29 إلى 235 ميكروغرام لكل قذيفة، لكن كان هناك انخفاض كبير في التعبير عند استخدام تركيز منخفض (15 µg). الهبوط في التعبير بالكميات الأقل من الذهب، يمكن تفسيرها من نتائج تجربة انحلال الـ دنا، والتي تبين فيها أن 0.25 ملغ من الجزيئات، لم تكن كافية لحمل الراسب ذو الـ 5 µg من البلاسميد دنا. من المهم تصغير كمية جزيئات الذهب المستخدمة للقذف، وذلك لتخفيض الضرر الذي تعاني منه الأنسجة المستهدفة. لوحظ أن الأنسجة غير المقذوفة والأنسجة المقذوفة بكميات أقل من الذهب وبضغط أقل، أظهرت تجدد نموات أفضل من تلك المقذوفة بحمولات جزيئات أعلى وبضغط أعلى. هذا التأثير كان أكثر بروزاً في أصناف القمح ذات الاستجابة الضعيفة لزراعة الأنسجة.

١.٢.٢. ٣. ٢. ٤. ٦ . المصادر البديلة وأحجام جزيئات الذهب. حسب كل وحدة وزن، جزيئات الذهب 1.0-µm من شركة بيوراد، حملت دنا أقل من جزيئات 0.4 -1.2-µm من شركة Heraeus أو جزيئات 0.6-µm من بيوراد. هذا يمكن أن يكون بسبب مساحة السطح الإجمالية الأصغر لترسيب الـ دنا التي تمثلها الجزيئات الأكبر أو مميزات سطح الجزيئة. لكن الاختلاف الملاحظ كان أن القذف بجزيئات 0.6-µm من بيوراد، نموذجياً أنتج وحدات تعبير أوضح من تلك الحاصل عليها من جزيئات 0.4 -1.2-µm من Heraeus أو جزيئات 1-µm من بيوراد. هذا ربما يكون مرتبط بملاحظة أنه بجزيئات 0.6-µm، فان تكتل الجزيئات أثناء الترسيب كان أقل وضوحاً منه في حال الجزيئات الأكبر. علاوة على ذلك، استخدام الجزيئات الأصغر، من المتوقع أنه يقلل ضرر النسيج.

١.٢.٢. ٣. ٢. ٤. ٧ . معايير قذف الجزيئات

١- **ضغط التسارع.** لم يكن هناك اختلاف كبير في تعبير المورثة GUS عند ضغط 650-1100 psi، بينما انخفض التعبير بشكل كبير عند ضغط أعلى. عدا عن التأثير الواضح على عمق الاختراق (النفوذ)، فان ضغط التسارع أيضاً له تأثير مهم على انتشار الجزيئات. فقد أدى استخدام ضغوط تسارع منخفضة (650-1100 psi) إلى تغطية مساحات أكبر بالجزيئات منه بضغوطات التسارع الأعلى (1300 and 1550 psi). وأظهر التحليل الميكروسكوبي أنه عند ضغط قليل، حدوث التعبير كان متجانس التوزع وبكثافة أقل نسبياً، وبالتالي يخفض صدمة القذف وضرر النسيج. عند الضغوطات العالية، مساحة صغيرة من الأنسجة المستهدفة كانت مستهدفة بقوة، وبالتالي تضررت، بينما الأنسجة عند الحواف، أظهرت حدوث تعبير قليل جداً.

٢- **ضغط تفريغ الحجرة:** وجد أن تسليم الـ دنا بالبندقية / المدفع PDS-1000/He كان فعالاً بشكل كبير عند 28 انش زئبقي، بينما لم تسمح ضغوط التفريغ الأقل للجزيئات بالوصول إلى النسيج الهدف.

٣- **مسافة القذف** (الفجوة والهدف). يوجد ثلاث مسافات يمكن تعديلها والتي تؤثر على تسليم الجزيئات باستخدام البندقية/ المدفع PDS-1000/He، أعني مسافة الفجوة (بين قرص التمزيق rupture disk والحامل الكبيرmacrocarrier)، ومسافة سفر الحامل الكبير (بين الحامل الكبير وشاشة التوقيف) ومسافة الهدف (بين شاشة التوقيف وطبق الهدف). مسافة الحامل الكبير النظامية هي 0.8 سم. وجد أن ضم مسافات الفجوة والهدف والذي أعطى تعبيراً مؤقتاً مثالياً لكلا النوعين من الأنسجة (الفلقة والازهرار) كان 2.5 و 5.5 cm على التوالي. أدت زيادة إحداهما أو كلا المسافتين إلى انخفاض كبير في التعبير المؤقت للمورثة GUS.

٤- **القذف المتعدد**. لم يكن هناك اختلاف كبير في تعبير الـ GUS عند تنفيذ قذفة واحدة أو قذفات متعددة (٢-٣ مرات) على أنسجة القمح. القذفات المتعددة مفيدة بشكل رئيسي عندما يكون التسليم الأولي للـ دنا غير فعال، لكنه يزيد الضرر للأنسجة الهدف، وبالتالي غير مرغوب للتحوير الثابت/ المستدام.

١.٢.٢. ٣. ٢. ٤. ٨ . معايير زراعة الأنسجة

الشروط الأسموزية لأنسجة المستزرعات

حسنت زراعة أنسجة الفلقات على سكروز 6% (0.18 M) و (0.27 M) 9% بشكل كبير التعبير المؤقت للمورثة GUS، بالمقارنة مع الأنسجة المزروعة على 3% (0.09 M) سكروز. ولوحظت استجابة مماثلة من الأنسجة الزهرية المزروعة في 9% (0.48 M) مالتوز، مقارنة مع 3% (0.16 M). المعاملات الأسموزية العالية قصيرة الأجل (بلاسموليزيز/تحلل بلاسمي) نموذجياً لبضعة ساعات قبل أو بعد القذف، يعتقد بأنها تخفض تسرب السيتوبلازم من الخلايا أو الأنسجة الهدف. وتستخدم المواد الأسموزية غير القابلة للاستقلاب، مثل: المانيتول والسوربيتول والبولي ايثيل غليكول أو جمعها مع بعض بشكل شائع بمستويات أسموزية تتراوح من 0.25 مول إلى 0.5 مول. في طريقتنا، عرضنا فلقات وأزهار القمح إلى مستويات سكر مرتفعة طوال فترة تخليق الكالوس كاملة. وجود هذه العوامل الأسموزية القابلة للاستقلاب (0.27 مول سكروز، 0.48 مول مالتوز)، أيضاً وجد أنها تحسن استجابة الزراعة طويلة الأجل والتحوير الوراثي الثابت.

(Adrian *et al.* 2003; Barnum 1998; Chawla 2004; Nicholl 2002; Phillip 1998 a,b,c ; Zaid 2001)

١.٣. طرائق كشف وتحديد العضويات المعدلة وراثياً

١.٣.١. تحويل المعلومات الوراثية من الـ دنا إلى النمط الظاهري.

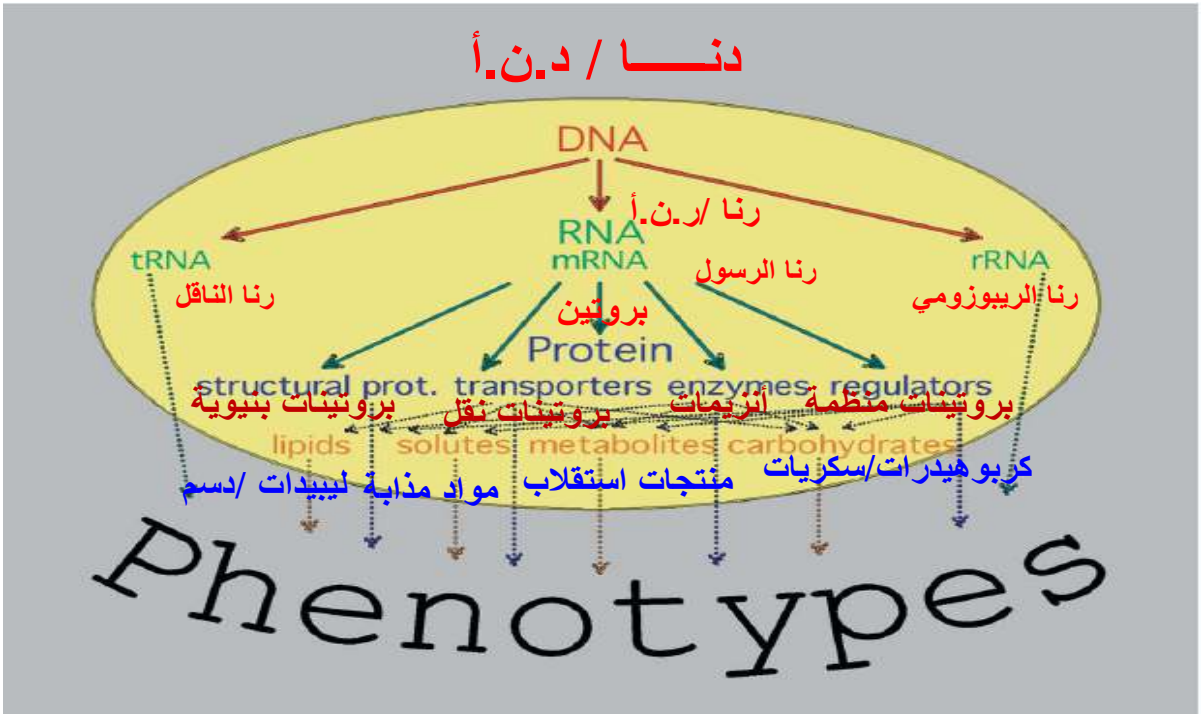
تخزن المعلومات الوراثية في كل العضويات سواء كانت أحادية أو متعددة الخلايا في الـحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (دنا DNA)،على شكل نيوكلوتيدات منقوصة الأوكسجين، يدخل في تركيب كل منها أساس (أدنين A، غوانين G، ثيمينT وسيتوزين C) وسكر خماسي منقوص الأوكسجين وحمض الفوسفور. هذه المعلومات هي التي تحدد الخصائص الوظيفية للكائن الحي، كنتيجة لعمليتين بيولوجيتين متتاليتين هما النسخ والترجمة (Alberts *et al*., 2002) (شكل ١). في الخطوة الأولى- النسخ- يتشكل الـ رناRNA. هذا الجزيء وحيد السلسلة هو – مع استثناءين- نسخة واحدة لسلسلة واحدة من الـ دنا. الاستثناء الأول هو: أن هيكل الـ رنا يحتوي على السكر الخماسي العادي الريبوز في تركيب اليوكليوتيد عوضاً عن ا لـسكر منقوص الاوكسجين ديوكسي ريبوز في الـ دنا. والاستثناء الثاني هو: أن الـ دنا يحتوي الثيامين في تسلسله، بينما يحوي الـ رنا على الأساس البيريميدني اليوراسيل في تركيب اليوكليوتيد.

عموماً، تصنع ثلاث أشكال من الـ رنا هي: رنا الناقل (tRNA) ورنا الريباسي (rRNA) ورنا الرسول أو ناقل النبأ الوراثي (mRNA) (شكل ٢). الأنواع الثلاثة من الـ رنا هذه كلها ضرورية لتصنيع البروتين، والذي هوالخطوة البيولوجية الأساسية الثانية، أي الترجمة. فقط رنا الرسول والذي يستخدم كقالب لتصنيع البروتين هو الذي يحدد تسلسل الحموض الأمينية للبروتينات، الـ رنا الناقل و الـ رنا الريباسي هي جزئيات مساعدة ضرورية كمكونات للآلية الوظيفية لتصنيع البروتين. فالمورثة هي قسم من الـ دنا الذي يحمل المعلومات الوراثية اللازمة لتركيب السلسلة البروتينية المكونة من تتالي محدد للحموض الأمينية. يعمل دنا المورثة على تشكيل جزيئة رنا الرسول. حيث تقوم احدى سلسلتي الـ دنا ببناء هذه الجزيئة بحيث تكون الأسس فيها متممة للأسس الموجودة في سلسل الـ دنا الفعالة sence. ينتقل رنا الرسول من النواة الى السيتوبلازم حيث يصبح على تماس مع الجسيمات الريبية مشكلاً معها القالب polusomes والذي تبنى عليه جزيئة البروتين. ويعادل عدد الحوض الأمينية في سلسلة البروتين عدد الشيفرات codes التي قرأها الجسيم الريبي. وتتألف الشيفرة الوراثية من تتالي لثلاثة أسس تسمى كودون.

```
DNA:              5'..A CGG ATA GCA TGG AAT CGA CAG TTG CAG G..3'
                  3'..T GCC TAT CGT ACC TTA GCT GTC AAC GAC C..5'
  Transcription    ...                                        .....
mRNA              5'..A CGG AUA GCA UGG AAU CGA CAG UUG CAG G..3'
  Translation      ...   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓   .....
Protein      N-term. ...R   I   A   W   N   R   Q   L   Q...C-term.
```

شكل ١. المعلومات الوراثية من الـ دنا إلى البروتين.

للبروتينات وظائف مختلفة داخل وخارج الخلية كعناصر بنيوية ومنظمة وناقلة وأنزيمات. الأخيريتين بشكل خاص لهما دور في تصنيع مكونات بنيوية أخرى للخلية ذات وزن جزيئي عالي هي الليبيدات والبولي سكاريد (سكريات متعددة). كنتيجة لفعل العناصر البنيوية والأنزيمات، تحتوي سيتوبلازم الخلية مواد ذات وزن جزيئي قليل وعالي ذوابة وغير ذوابة والتي تعكس التفاعل بين الظروف البيئية (عوامل كيميائية وفيزيائية) والعوامل الخلوية الداخلية (طور النمو، طور التمايز ...الخ). تساهم العناصر البنيوية والوظيفية بالخواص الممكن قياسها بالخلية والتي تدعى الأنماط الظاهرية. لذلك، فان النمط الظاهري هو انعكاس مباشر للنمط الوراثي (شكل ٢) (Knut and Heller, 2006)



أنمـــــاط مظهـــــرية

شكل ٢. تحويل المعلومات الوراثية بالـ دنا إلى أنماط ظاهرية

١.٣.٢. ما هي الكائنات المعدلة وراثيا؟

الكائنات المعدلة وراثياً هي العضويات التي غيرت فيها المادة الوراثية ليس بالطريقة التي تحدث طبيعياً بالتزاوج و/ أو الاندماج الطبيعي.

يحدث التعديل الوراثي على الأقل باستعمال الثلاث تقنيات التالية:

١- تقنيات الـ دنا المأشوب باستخدام نظام النواقل.

٢- التقنيات التي تتضمن النقل المباشر إلى العضوية للمادة الوراثية الممكن توريثها والمحضرة خارج العضوية والتي تشمل الحقن الدقيق والكبسولات الدقيقة وغيرها.

٣- الدمج الخلوي (بما فيه دمج البروتوبلاست) أو تقنيات التهجين حيث تشكل الخلايا الحية مع التركيبات الجديدة من المادة الوراثية القابلة للتوريث من خلال دمج خليتين أو أكثر بوساطة الطرائق التي لا تحدث بشكل طبيعي.

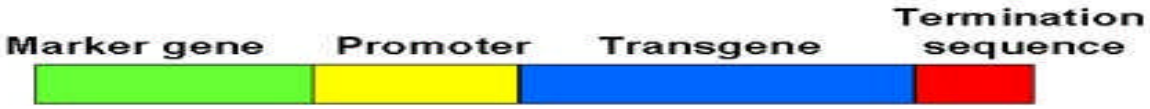
تتم التعديلات الوراثية بإدخال عدة أجزاء صغيرة من الـ دنا من مصادر مختلفة إلى التركيب الوراثي (جينوم/مجين) النبات المراد تعديله وراثياً. وعموماً، تتم معالجة المورثة المعزولة المرغوبة بحيث تعبر وراثياً عن نفسها Gene Expression. ولذلك يتم تركيب ما يسمى gene construct أو المورثة الكيميرية بحيث يمكن أن يتم التعبير الوراثي، أي نسخ المورثة لنفسها وتكوين mRNA الذي يتم ترجمته على الريبوزومات، وبالتالي تصنيع البروتين اللازم لإظهار الصفة المرغوبة (الشكل المظهري Phenotype).

يجب أن تتكون هذه المورثة من ثلاثة مناطق هي:

- **المنطقة الأولى**: تسمى المحفز Promoter Sequence وهي التي تساعد في تحديد توقيت عمل المورثة (متى تعمل) وموقع تعبيرها (أين تعمل)، فهي بمثابة شيفرة للمورثة نفسها، أي تحدد وتقول لها من أين تبدأ في نسخ الرنا الرسول (ابدأ من هنا).
- **المنطقة الثانية**: هي منطقة التشفير وهي تحمل معلومات تحدد طبيعة البروتين الذي تشفره المورثة structure gene
- **المنطقة الثالثة**: منطقة تعدد الأدننة poly- A (Ploy adenylation) أو الإنهاء، وهي المسؤولة عن إنهاء عمل نسخة الـ mRNA الرسول RNA transcript Messenger على الوجه الصحيح، وكأنها تقول للمورثة أنهي عملية النسخ هنا (أنهي هنا).

ولذلك يتألف مركب المورثة (شكل ٢) نموذجياً من العناصر التالية:

- المحفز: يعمل كمفتاح تشغيل وإغلاق لمتى وأين تعمل المورثة المعدلة/ المدخلة في النبات /العضوية المستقبلة.
- المورثة المعدلة / المدخلة (المورثة البنيوية): تشفر لصفة / خاصية معينة.
- المنهي: يعمل كشارة توقف لنسخ المورثة المدخلة / المعدلة.
- المورثات المعلمة من أجل التمييز بين الكائنات المعدلة وغير المعدلة وراثياً أثناء تطوير المحصول.
- بقايا مادة الـ دنا من بلاسميدات الإدخال.



شكل ٢. تمثيل مبسط للمورثة المركبة والمحتوية المكونات الرئيسية للإدخال والتعبير الناجح .
(after:.http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops/how.html#breeding;Lubeck 2001).

١.٣.٣. الـ دنا والبروتين والنمط الظاهري كأهداف لتحاليل الكشف عن التعديل الوراثي.

فيما يخص الكائنات المعدلة وراثياً والتي تم تعديلها بالطفرات الطبيعية أو بالهندسة الوراثية، فان المعلومات حول النمط الوراثي للكائنات يمكن الحصول عليها على كل مستويات عملية تحويل المعلومات الوراثية إلى صفات/ خواص بنيوية ووظيفية، على مستوى الـ دنا، وعلى مستوى الـ رنا، وعلى مستوى البروتين، وعلى مستوى المواد الخلوية غير الحمض النووي وغير البروتينية.

وربما تتباين الاستنتاجات حول التعديل الوراثي التي يمكن استخلاصها من الكشف على مستويات مختلفة بشكل كبير. يمكن توضيح ذلك بثلاثة أمثلة:

١- خلايا سلالة بكتيرية والتي هي بشكل طبيعي غير قادرة على تفكيك النشاء واستخدام أجزاء السكر للنمو بسبب عدم وجود أنزيمات مناسبة لها نمط ظاهري "النمو على النشاء كمصدر وحيد للكربون". هذا الاستنتاج هو دقيق نوعاً ما – الخلايا يجب أن يكون لديها على الأقل مورثة واحدة تشفر للأنزيم المفكك للنشاء المفرز. هذا يثبت أن مورثة جديدة قد أدخلت إلى

الخلايا. المورثة، رنا الرسول، أنزيم التفكيك ومنتجات تفكيك النشاء، يمكن كلها أن تخدم كمواد يمكن أن يعتمد عليها اختبار الكشف.

٢- نباتات فول الصويا والتي هي بشكل طبيعي حساسة لمبيد عشبي معين هي مقاومة لذاك المبيد العشبي. تفسيرات مختلفة محتملة. فالنباتات امتلكت كنتيجة للهندسة الوراثية المورثة التي تشفر للأنزيم المفكك للمبيد العشبي، أو أن النباتات خضعت لطفرات تلقائية ذاتية بحيث أصبحت إما تحول دون امتصاص المبيد العشبي إلى النبات أو غيرت الهدف للمبيد العشبي ضمن الخلايا النباتية. لاستبعاد احتمال الطفرات الذاتية، يوجد خيارات مختلفة لإثبات أن التعديل الوراثي ممكن. المورثة التي تشفر للأنزيم، رنا الرسول المنسوخ من المورثة، البروتين الناتج من تعبير المورثة أو منتجات تفكيك المبيد العشبي الخاصة بالأنزيم المستخدم يمكن كشفها بالاختبارات المناسبة.

٣- خلايا سلالة البكتريا التي هي قادرة بشكل طبيعي أن تنمو على اللاكتوز كمصدر كربون وحيد تتحول إلى نمط ظاهري سلبي للاكتوز، أي أنها ليست قادرة على استخدام اللاكتوز. تفسيرات مختلفة محتملة. فالبكتريا اكتسبت – من خلال الهندسة الوراثية أو طفرة تلقائية- فيها خلل في المورثات التي تشفر للبروتينات الناقلة للاكتوز أو في المورثات التي تشفر للأنزيمات الضرورية لاستقلاب اللاكتوز أو السكر. نظراً لأنه لا يوجد منتجات تفكك أو بروتينات أو رنا رسول خاصة من أجل التحليل، فان الطريقة الوحيدة لاستبعاد الطفرة التلقائية هي تحليل موقع المورثة المحتمل بتأثره بواسطة التعديل الوراثي.

عند تصميم اختبارات للكشف عن التعديلات المدخلة بالهندسة الوراثية، فان موثوقية الاختبارات يجب أن تدرس. ففي المثال ١، تحديد النمط الظاهري ربما يكون اختباراً مقنعاً، لكن في المثال ٢، تحديد النمط الظاهري ليس ذو قيمة، فالاختبار الموثوق يجب أن يعتمد على منتجات تفكك معينة أو أنزيمات معينة أو رنا الرسول أو دنا. بينما في المثال ٣، فقط الاختبارات المعتمدة على تحديد تسلسلات دنا معينة هي التي تعطي نتائج موثقة.

الانحلال أو التفكك الذي يحصل بالمعلومات الوراثية أثناء التحول إلى خواص بنيوية أو وظيفية يجب أيضاً أن يؤخذ بالحسبان. العملية البيولوجية الوحيدة الناتجة في 1:1 نسخة كاملة من الـ دنا هي التضاعف. النسخ عادة ينتج 1:1 نسخة من مناطق الـ دنا المنسوخة (شكل ٣). ومناطق الـ دنا غير المنسوخة لا تظهر أبداً على مستوى الـ رنا. علاوة على ذلك، وخصوصاً في الكائنات الراقية، النسخة

الأولية المنتجة بخطوة النسخ ربما تتغير بعملية تحرير والتي يحذف فيها تسلسلات معينة من نسخة الـ رنا الأولية تدعى انترونات لتشكل الرنا الرسول الحقيقي. أثناء الترجمة، تفقد أو تبهم معلومات إضافية. وهذا يمكن أن يكون له عواقب عديدة هي أنه: كما هو أثناء عملية النسخ، فقط جزء من رنا الرسول يترجم إلى بروتين. المناطق المترجمة تدعى "إطار القراءة المفتوح". كما أن الإطار ذو ثلاث نيوكليوتيدات رنا الرسول (كودون) ضروري لتشفير لحمض أميني واحد. ثلاثة نيوكلوتيدات من أربعة تعطي احتمال تشكيل ٦٤ تركيباً مختلفاً. ونظراً لأنه فقط ٢٠ حمض أميني تستخدم لتصنيع البروتين، فان عدة كودونات تشفر لنفس الحمض الأميني. الحموض الأمينية: سيرين، ليوسين، وأرجنين كل منها تشفر بستة كودونات مختلفة. فقط الميثونين والتربتوفان تشفر كل منها بكودون واحد. لذلك، فان تسلسل الحمض الأميني للبروتين هو مناسب جزئياً لاستنتاج التسلسل النيوكليوتيدي للـ رنا الرسول.

بروتينات كثيرة، تخضع لعملية بعد الترجمة. أحد نتائج هذه العملية ربما يكون إزالة جزء من سلسلة البولي ببتيد. ومن الواضح أنه لا يمكن استنتاج أي معلومات وراثية على تسلسل رنا الرسول أو تسلسل الـ دنا من الأجزاء المزالة من البروتين الناضج. بينما يسمح تحليل تسلسل الـ رنا والبروتين ببعض الاستنتاجات حول تسلسل الـ دنا، وتحليلات المكونات الأخرى للخلية (ليبيدات، كربوهيدرات، نواتج استقلاب ومحاليل، (شكل ٣) وأنماط ظاهرية لا تعطي أي شارة حول تسلسل الـ دنا. على الرغم من أن مثل هذه التحاليل، كما هو مبين أعلاه، ربما تشير إلى وجود تعديل وراثي، فانه لا يتحصل على معلومات حول الطبيعة الحقيقة للتعديل. وبذلك، فان الجزيء الهدف المثالي لكشف التعديلات المهندسة وراثياً هو الـ دنا. وهذا صحيح لأن معظم الطرائق التحليلية الحساسة والسريعة القوية هي متوفرة للـ دنا. إدخال مورثة غريبة إلى دنا عضوية ما يمكن أن يكشف بشكل واضح لا لبس فيه فقط على مستوى الـ دنا. مثلاً، وجود أنزيم بكتيري في مستخلص نباتي ربما يكون نتيجة تلوث. طالما أن الأنزيم لم يتعرض للتغيير بعمليات بعد الترجمة خاصة للبكتريا أو للنباتات، فان البروتين نفسه سوف لن يظهر ما إذا قد تم التعبير عنه في النبات أو في البكتريا. المورثة المطابقة والتي تم استنسالها في تركيب ناقل، والمحورة إلى النبات ومدمجة في دنا النبات يمكن دائماً تحديدها كمورثة غريبة لأنها محاطة بتسلسلات دنا والتي لا تحيط بهذه المورثة في الحالة الطبيعية. لذلك، الاختبار الذي يستهدف مواقع التحام تسلسل اثنان من الـ دنا بمناطق مختلفة يحدد بشكل لا لبس فيه ناتج عملية الهندسة الوراثية، أي تسلسلات الـ دنا الغريب والموجودة حصراً في تركيب الـ دنا المأشوب وليس في أي مكان أخر.

١.٣.٤. طرائق وخطوات عملية الكشف عن المواد المعدلة وراثياً ومشتقاتها الجزيئية

يمكن فحص وتعريف المواد المعدلة وراثياً بكشف إما:

- المادة الوراثية المدخلة على مستوى الـ دنا
- الـ رنا الرسول المنسوخ من المورثة المدخلة الجديدة.
- البروتين الناتج
- النمط الظاهري

- الطرائق المعتمدة على كشف الـ دنا: تعتمد على تضخيم تسلسل محدد من الـ دنا باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي البوليميرازي " بي سي أر. وان أحد أكثر التقنيات الشائعة التطبيق لإثبات وجود الـ دنا أو الـ رنا هي الرحلان الكهربائي عبر هلامة الأغاروز، وهي التقنية التي تتيح تقدير كمية وحجم الـ دنا/ رنا. هذا يمكن بالنهاية أن يترافق مع هضم بالأنزيمات المحددة والمعروفة بأنها تقطع القطعة المضخمة بالـ بي سي أر إلى قطع ذات أحجام محددة.

- الطرائق المعتمدة على الـ رنا: تعتمد على ارتباط معين بين جزيء الـ رنا ورنا مصنع أو جزيء دنا مصنع (يسمى بادئ). هذا البادئ يجب أن يكون متمم لتسلسل نيوكليوتيدي عند بداية جزيء الـ رنا. والنتيجة هي جزيء نظامي مضاعف السلسلة مماثل للـ دنا.

- طرائق الكشف المعتمدة على البروتين: تعتمد على ارتباط معين بين البروتين والجسم المضاد. الجسم المضاد يتعرف على الجزيء الغريب ويرتبط معه. وفي اختبارات الكشف عن المواد المعدلة وراثياً، المركب المتحد يمكن كشفه على التوالي في تفاعل لوني. هذه التقنية تسمى اختبارات الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم (اليزا). الجسم المضاد المطلوب لكشف البروتين يمكن تطويره بدون الوصول إلى البروتين النقي. هذا البروتين يمكن أن ينقى من الكائن المعدل وراثياً نفسه، أو يمكن أن يصنع في المخبر إذا عرف تركيب البروتين بالتفصيل (Holst-Jensen 2001, Lubeck 2003, Arvantoyannis 2003).

- طرائق معتمدة على كشف النمط الظاهري : تعتمد على كشف النمط الظاهري الناتج مثل تحمل مبيد عشبي.

وبغض النظر عن طريقة الكشف المتبعة، فان عملية التحليل لوجود مواد معدلة وراثياً أو مشتقاتها في المواد الغذائية هي حسب الخطوات التالية:

١- أخذ العينات من المادة المراد تحليلها.
٢- إجراء تجانس للعينة.
٣- عزل وتنقية الـ دنا، رنا، بروتين.
٤- التحليل لتحديد ما إذا الجزيء الناتج من مادة معدلة وراثياً موجود أو لا.
٥- تعريف الجزيء المكتشف.
٦- تحديد كمية المادة المعدلة وراثياً الموجودة في العينة.
٧- تفسير تحاليل النتائج، مبينا أية شكوك مترافقة مع النتيجة مثل عدم الدقة الإحصائية والعوامل المحددة للطريقة، وغير ذلك

(Holst-Jensen, 2001; Lubeck, 2001; Bonfini *et al,* 2002 ; VanDuijn *et al*, 2002 and Arvantoyannis, 2003).

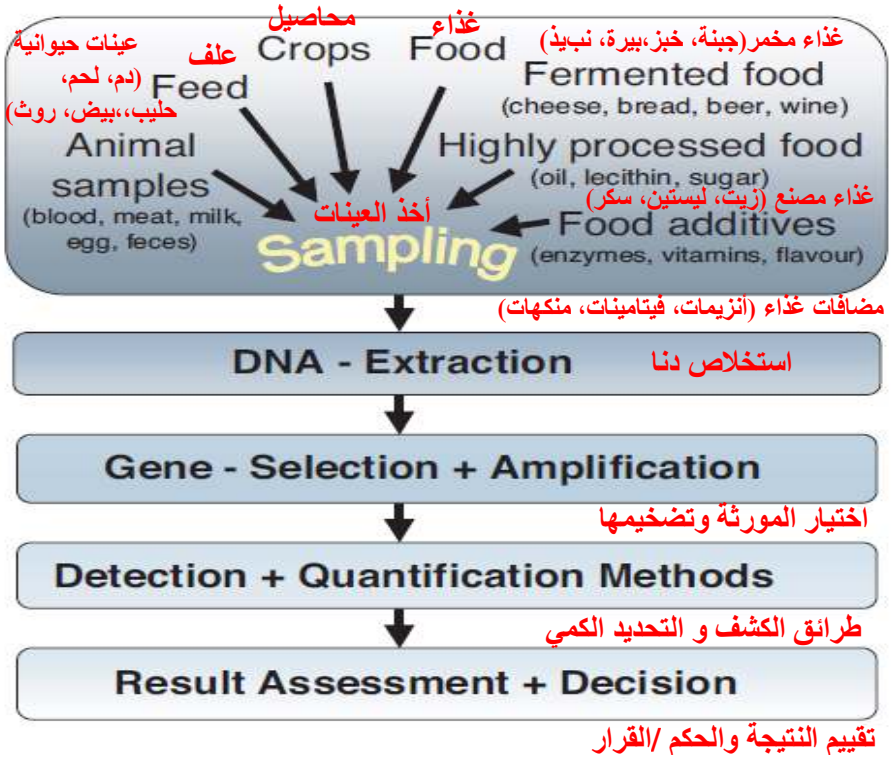
١.٣.٤. ١. الطرائق المعتمدة على الـ دنا لكشف التعديلات الوراثية

يعتمد كشف وتحديد كميات الكائنات المعدلة وراثياً في المواد الخام بما فيها المكونات والمنتج النهائي على كشف الـ دنا باستخدام ا لـ "بي سي أر" للبحث عن تسلسلات الـ دنا التي أدخلت إلى النباتات.

١.٣.٤. ١. ١ . المخطط العام للاختبار

تتبع طرائق الغربلة والكشف وتحديد كمية المواد المعدلة وراثياً بالاعتماد على الـ دنا في عينات المواد الغذائية والعلفية باستخدام تقنيات الـ دنا التسلسل التالي: أخذ العينات، استخلاص الـ دنا، التضخيم بالـ بي سي أر، الكشف، تحديد الكمية والتقييم العلمي للنتائج (شكل ٤). ومن الواضح أن كل خطوة من هذه الخطوات لها عوامل محددة، لكن المواد المعقدة بشكل كبير ربما تتطلب معاملة أولية بشكل منفصل. الاستنتاج النهائي مرتبط مباشرة بالاختيار المناسب للطرائق الموثقة حسب البروتوكولات المعتمدة عالمياً. وهناك دراسات مرجعية عديدة منشورة

(Kuiper, 1999; Anklam et al., 2002 and Holst-Jensen and Berdal, 2004).



شكل ٤- مخطط عام لتحليل الكائنات المعدلة وراثياً يبين الخطوات الرئيسية بدءاً من جمع العينة حتى الحكم النهائي. كل من هذه الخطوات يجب أن تقيم بالتفصيل، وبالنهاية تثبت بإجراء تجارب عالمية بجهود مكثفة. الطرائق المخبرية الإلزامية تحرر (تنشر) على أساس أنها من حيث المبدأ تقدم وسائل موثقة لكشف التعديلات الوراثية في الغذاء والعلف.

١.٣.٤. ١. ٢ . إجراءات أخذ العينات

إن أهم شرط أساسي لتحليل الـ دنا اللاحق هو أخذ عينة ممثلة والتي تضمن استنتاج دقيق إحصائياً. بسبب التباين/عدم التجانس الكبير بالمواد الغذائية المتنوعة جداً، فانه من الضروري تطوير خطط خاصة لأخذ العينات (Gilbert 1999). كنتيجة منطقية، فان نتيجة الطرائق التحليلية اللاحقة تكون جيدة بقدرجودة نوعية أخذ العينات. غالباً، هناك طريقين محتملتين للمناقشة وكلاهما لا بد أن تؤدي إلى وضع خطط مناسبة لأخذ العينات وهما:

تشكيل عينة كبيرة ثم أخذ عينات فرعية منها أو

إيجاد عينات متعددة.

بالإضافة إلى ذلك، حجم الجزيئات وتوزع المادة الخام يجب أن يؤخذ بعين الاعتبار، وكذلك الوقت لذي تؤخذ به العينات أثناء عملية الإنتاج.

ويجب الانتباه جيداً للحيلولة دون حدوث تلوث مما يستلزم اتخاذ احتياطات فيزيائية كبيرة عند تداول المادة المهندسة وراثياً. بدءاً من أخذ العينات وحتى التحليل المخبري، فانه يجب استبعاد الايروسول /بخار ضبابي، غبار/ والأدوات والمواد المستهلكة الملوثة. من وجهة نظر عملية، يجب توفر مواد مرجعية حقيقية للمورثات المنتخبة (مثلاً، الذرة Bt 176)، على الرغم من ضرورة تطوير معايير دولية وإجراءات للـ دنا والتي يجب أن تتوفر لكل كائن معدل وراثيً ولكل مادة غذائية وغذاء مصنع افرادياً.

١.٣.٤. ١. ٣ . استخلاص وتنقية الـ دنا

بالاستفادة من ميزة وجود المادة الوراثية دنا في كل كائن، فان كل المواد المهندسة وراثياً ستعرف ما إذا فضالة (بقايا) الـ دنا الممكن استخلاصه موجود وتسلسل المورثة المقصودة معروف. لذلك يجب دراسة تلاؤم الطرائق المختلفة لاستخلاص وتنقية الـ دنا من عينات مواد من مصادر متنوعة. إن عزل وتنقية الدنا المحمول بالكائن المعدل وراثياً من عينات من مصادر مختلفة هو الخطوة المفتاحية الأولى في الإجراءات هذه كلها. ومن هنا، فان إجراءات الاستخلاص الفردية التي تؤدي إلى إيجاد طريقة تنقية لمجال متنوع من المواد يشكل جزءاً حيوياً من العملية. نموذجياً، تفرق العينات ميكانيكياً و/أو تعامل بالأنزيمات لحل الـ دنا بمساعدة المركبات العضوية (فينول، كلوروفورم)، مواد منظفة، أنزيمات (الأنزيمات المفككة للـ رنا RNAse والأنزيمات المفككة للبروتينات protease) والأملاح المختلطة. الترسيب اللاحق بالكحول للـ دنا يؤدي إلى تركيزه وتنقيته. بالإضافة إلى ذلك، الإجراءات العالية الدقة

يمكن أن تستفيد من تبادل الأيونات وكروماتوغرافيا السيليكا والجزيئات الزمرية الجاذبة (المغناطيسية)، والتي ترتبط انتقائياً بالحموض النووية في مجال ضيق لحموضة الأملاح وظروف مذيبات عضوية محددة، وبالتالي تمكن من التقاط وغسيل وترشيح الـ دنا ضمن نفس الخرطوشة. طرائق الاستخلاص هذه والتي يمكن تبنيها واعتمادها للتطبيقات الآلية الروتينية، تعطي طريقة عملية قياسية جداً لتنقية الـ دنا (مع تلوث عرضي قليل وتباين منخفض بالعينات الفردية مماثل لنقاوة وتجانس الـ دنا). لكن، من جهة ثانية، هذه الطرائق يجب أن تختار بحيث تكون مناسبة للحصول على دنا عالي النوعية نسبياً على الرغم من الكمية القليلة أحياناً. في الحقيقة، هناك عدد من الحالات والتي كان استخلاص الـ دنا فيها محدوداً (مثال: مواد ذات مشاكل، على سبيل المثال: زيت فول الصويا، قد تم تجاوزها بنجاح باستخدام إجراءات فردية خاصة تم وضعها للعينات الصعبة

(Pauli *et al*., 1998 and Gryson *et al.,* 2002; Querci *et al*, 2006).

١.٣.٤.١. ٤. طرائق تضخيم الـ دنا

١.٣.٤.١. ٤. ١. التفاعل التسلسلي للبوليميراز "بي سي أر" الكيفي التقليدي

المشكلة المتكررة بالنسبة لمراقبي الغذاء هو التوفر المحدود في مادة العينة للجزيئات الهدف المراد تحليلها. عند إجراء طريقة الاستخلاص الأساسية، فان مادة الـ دنا ذات التوفر القليل، يمكن اغناؤها بإدخال تفاعلات تضخيم انتقائية والتي تستفيد من تضاعف الحمض النووي الذي يحدث طبيعياً. الهدف من هذه الطريقة هو تجميع الكميات القليلة من الحموض النووية المميزة مما يمكن من تعريف وتحديد الكمية.

تم تطوير التفاعل التسلسلي للبوليميراز "بي سي أر" عام ١٩٨٥ من قبل كاري موليز kary B. .Mullis، انه جهاز بسيط لكنه فعال لكشف كميات دقيقة من تسلسلات الـ دنا. ا لـ بي سي ر أكثر الطرائق انتشاراً لكشف وتحديد المواد المعدلة وراثياً.

ان مبدأ التفاعل التسلسلي البوليمرازي بسيط جداً فهو يعتمد على عمل أنزيم النسخ DNA polymerase حيث أن هذا الأنزيم قادر على تركيب جزيئة مضاعفة من الـ دنا من القالب أو النسخة الأصل من الـ دنا في الدورة الأولى من المضاعفة، وهذه الجزيئة تصبح القالب الثاني لدورة أخرى من النسخ، ويسمح ذلك بتكرار النسخ بزيادة أسية في منتجات الـ دنا المتراكمة. وعليه فانه يمكن من جزيئة دنا مفردة الحصول على ملايين النسخ من الـ دنا الهدف (الجزء المراد مضاعفته) بوساطة هذا التفاعل خلال ساعات قليلة. وعموماً، تتضمن دورة التفاعل الواحدة ثلاث دورات أساسية هي:

– دورة واحدة لفصل سلسلتي الـ دنا لمدة ٥ د. على درجة ٩٥ °م

- ٣٥-٤٠ دورة تتألف كل منها من:

أ- ٣٠ ثانية لفصل سلسلتي الـ دنا على درجة ٩٥ °م

ب- ثانية واحدة لارتباط البادئة مع الـ دنا القالب عند درجات تتراوح بين ٥٥-٦٨ °م

ت- دقيقة واحدة لتركيب السلسلة الجديدة عند درجة ٧٢ °م

- دورة واحدة لمدة ١٠ دقائق عند درجة ٧٢ °م

فالتفاعل التسلسلي للبوليميراز تقنية تسمح بمكاثرة قطعة محددة من الـ DNA، فمن جزيئة واحدة من الـ DNA تنسخ المليارات من الجزيئات المتماثلة، وتتمثل التقنية باستخلاص وتنقية الـ DNA، ثم مكاثرة القطعة (المورثة) المدخلة إليه، والكشف عن المنتج المكاثر والتأكد منه. حيث تمكن التقنية من المضاعفة الأسية للـ دنا مخبرياً على أساس الخواص الفريدة للأنزيم تاغ بوليميراز الثابت حرارياً والذي يستخلص من البكتريا المحبة للحرارة *Thermos aquaticus* والتي تعيش في الينابيع الحارة. استخدام الـ تاغ بوليمراز يعني أنه يمكن أتمتة إجراءات ا لـ بي سي أر، حيث أنه لا يوجد حاجة لإضافة بوليميراز طازج جديد بعد كل خطوة تفكيك للـ دنا، كما هو الحال عند استخدام أنزيم حساس للحرارة. إن تعرف اوليغونيوكليوتيدات قصيرة محددة (بادئات) والتي تتهجن/ تلتحم على قالب دنا مفرد وحيد السلسلة يؤدي إلى التضاعف اللاحق للـ دنا والتضخيم الانتقائي لأجزاء الـ دنا المحددة مسبقاً (شكل ٥). عملياً، بادئتان ضروريتان، بادئة لكل سلسلة من سلسلتي الـ دنا الثنائي السلسلة. البادئات يجب أن تكون على بداية حدود التسلسل المستهدف، ولذلك فان معلومات التسلسل مطلوبة عندما نريد إجراء تضخيم انتقائي محدد. البادئات الأوليغونيوكليوتيدية (قليلة النيوكليوتيدات) تبين حدود المنطقة المراد تضخيمها والـ دنا بوليمراز يكاثر الـ دنا بين البادئات باستخدام كل الأربعة ديوأوكسي ريبونيوكليوزيتيد ثلاثية الفوسفات والتي تضاف في أنبوب الاختبار وهي (dGTP,dATP,dCTP,dTTP).

والبادئة primer هي تتابع نيوكليوتيدي قصير مكمل للنهاية المعاكسة من التتابع الطرفي للـ دنا الهدف. ترتبط هذه البادئات الى التتابع المتمم (المكمل) في الموقع الهدف، ولذلك يتم بدءاً من هذه النقطة عملية المضاعفة أو التضخيم amplification. كما يتم تركيب شريطي جزيئة الـ دنا باتجاهين متعاكسين (دائما بالاتجاه ٥ الى ٣) ومن نقطة تتابع الأخرى على الشريط الأصل (القالب). تتم المضاعفة الفعلية لأية منطقة من جزئية الـ دنا بوساطة اختيار تتابع محدد كبادئات عند كل من طرفي المنطقة الهدف وذلك اعتماداً على التتابع النيوكليوتيدي للقطعة الهدف حيث يتم تصميم بادئات متخصصة من أجل مضاعفة تلك القطعة المحددة. وعموماً، يتم تفاعل ا لـ بي سي أر بجهاز التدوير الحراري، وهو جهاز يمكن

برمجته للتغير بشكل سريع من درجة حرارة ما إلى درجة أخرى. المواصفات الدقيقة الفنية الخاصة لهذه التقنية واسعة الانتشار موصوفة في العديد من المنشورات. فهناك دراسات شاملة نشرت من قبل Innis *et al.* (1990) و Rapley (1998). تنفيذ دورات عديدة (حتى ٤٠ دورة) بالتتابع يؤدي إلى تراكم أسي لجزيء الـ دنا المرغوب (مثلاً CryIA, pat, 35S) إلى حد الكمية الممكن كشفها في ناتج ا لـ بي سي أر المقصود (أمبليكون).

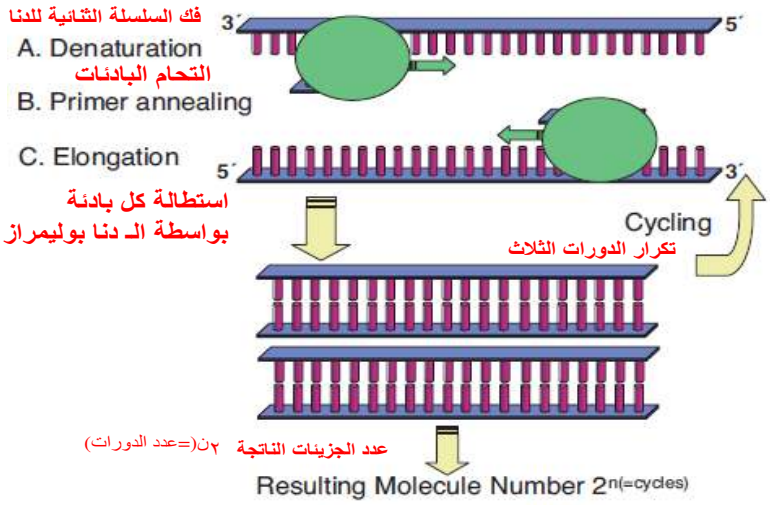
بهذه الطريقة، يصبح ممكن تضخيم كل مورثة مرغوبة (مثلاً المورثة المهندسة وراثياً) من الدنا المستخلص بالشكل المناسب. بعد التضخيم، الناتج (الامبليكون) وتخصصية ا لـ بي سي ر، يتم التأكد منها بواسطة أربعة طرائق شائعة هي:

١- الرحلان الكهربائي الذي يتم فيه تداخل صبغة معينة (مثل ايثيديوم بروميد) مع ناتج ا لـ بي سي أر (دنا) المضاعف السلسلة.

٢- الهضم بالأنزيمات المحددة ثم الفصل بالرحلان الكهربائي.

٣- لطخة ساوثرن Southern blotting بوساطة مسبار تهجين خاص بالهدف باستخدام إما مادة مشعة أو تعليم غير مشع.

٤- تحديد التسلسل الدقيق للـ دنا / سلسلة الـ دنا



شكل ٥. المخطط العام للـ بي سي أر. تتألف الدورة من ثلاث خطوات هن:

أ. فك السلسلة الثنائية للدنا المستهدف بالفصل الحراري لروابط الهيدروجين بين أزواج القواعد،

ب. البادئات بالاتجاهين الأمامي والعكسي تلتحم بمتممات من السلسلة المفردة من الـ دنا،

ت. امتداد /استطالة كل بادئة بواسطة الـ دنا بوليمراز الثابت بالحرارة مما ينتج سلسلة دنا مضاعفة جديدة . كل دورة تالية نظرياً سوف تضاعف العدد الأولي لجزيء الـ دنا، وبالتالي تمكن من الزيادة الأسية لجزيء الـ دنا الأولي الذي تم البدء به.

يمكن تصميم اختبارات ا لـ بي سي أر لكشف أي جزء من المركب المدخل: المحفز، المورثة البنيوية، أو المورثة المعلمة. يمكن استخدام ا لـ بي سي أر لغربلة الكائنات المعدلة وراثياً باستخدام بادئات تتعرف على العناصر المهندسة وراثياً التي تحتويها أغلب الكائنات المعدلة وراثياً، على سبيل المثال، المحفز 35S من فيروس موزاييك القرنبيط الشائع الاستخدام والمنهي nos من بكتريا التدرن التاجي

(Weijdeven 2003; Lubeck 2003; Somma and Querci 2001; Grandillo and Fulton 2002, Abdul Kader *et al.* 1999, 2003, Alassad, 2009).

وبالتعاقب، يمكن استخدام بادئات أخرى في الـ بي سي ر الكيفي.

في الحقيقة، هناك ثلاث استراتيجيات لاختيار الهدف المناسب هي:

١- كشف العناصر الوراثية الشائعة الوجود في الكائنات المعدلة وراثياً (المحفز 35S، المحفزnos ، المنهي nos، مورثة المقاومة للكاناميسين nptII). وهذا يدعى غربلة /مسح عام للكائنات المعدلة وراثياً، ويسمح بكشف وجود أو غياب الكائنات المعدلة وراثياً.

٢- كشف مركب مورثة معين، أي منطقة الوصل بين قطعتين لجزيئي دنا يمكن أن يكون الهدف لكشف محدد لمركب وراثي معين.

٣- كشف محصول/ منتج معين معدل وراثياً، أي حد الاتصال بموقع الاندماج (قطعة اتصال المركب بجينوم النبات)، يمكن أن تستخدم لكشف معلومات لمحصول معين معدل وراثياً (Holst-Jensen 2001, Lubeck 2003).

١.٣. ٤.١.٤.٢. طرائق الكشف المعتمدة على الـ "بي سي أر" المتعدد

بالطرائق المعتمدة على الـ بي سي أر المتعدد، يمكن غربلة وكشف عدة تسلسلات دنا مستهدفة في تفاعل واحد. على الرغم من أنه من حيث المبدأ يمكن جمع طرائق ا لـ بي سي أر القياسية في تفاعل واحد، لكن عملياً، فان هذا يحدث نوعاً من الخطر الكبير غير المقبول بإعطاء نتائج غير دقيقة عن تحاليل العينات الحقيقية.

أولاً: كل طريقة، ربما تتطلب شروط تفاعل مختلفة، مثلاً، أنظمة حرارة مختلفة أو تراكيز مختلفة من مواد التفاعل.

ثانياً: جمع لبادئات من طرائق مختلفة ربما يزيد خطر تضخيم أجزاء دنا غير الأجزاء المستهدفة.

ثالثاً: عندما يكون هناك أكثر من جزء واحد قيد التضخيم في تفاعل ا لـ بي سي أر، فان الجزئين قيد التضخيم يتنافسان على مواد التفاعل، الخ.

عادة، الجزء الموجود بعدد أكبر من النسخ البدائية سوف يتنافس مع الجزء الأخر الذي يمكن أن يكون موجود فقط بعدد قليل جداً. لكن، من جهة ثانية، إذا تم تضخيم الناتجين بكفاءة تضخيم مختلفة كثيراً، فان هذا أيضاً يمكن أن يكون له تأثير شديد على النسبة النهائية للمنتجين، مثلاً، إذا كانت أعداد النسخة الأولية أقل أو أكثر لكليهما. وبالنتيجة، فان تطوير الاختبارات المتعددة تتطلب اختبار وتوثيق دقيق. بعد ا لـ بي سي أر، الأمبليكون من أجزاء الـ دنا المضخمة الناتج يحتاج إلى تحليل إضافي للتمييز بين النواتج المختلفة. هذا يمكن عمله باستعمال مسبار تهجين معين بواسطة الرحلان الكهربائي ومقارنة أحجام القطع الناتجة أو باستخدام بادئات معلمة بشكل محدد. هنا فقط ورقة واحدة منشورة تبرز اختبار متعدد لكشف خمسة أنواع ذرة معدلة وراثياً هي: Bt11, Bt176, Mon810, T25, GA21 (Matsuoka *et al.,* 2001; Hemandez *et al*., 2005; Foti *et al*., 2006 and Randhawa *et al*., 2010; Holst-Jensen 2001).

١.٣. ٤.١.٤.٣. ا لـ بي سي أر باستخدام قالب الـ رنا الرسول

هذا نوع أخر للـ بي سي ار شائع الاستخدام يعرف بالنسخ العكسي للـ بي سي أر (RT-PCR). يمكن أن يكون مفيداً لتحديد المستويات المنخفضة من تعبير المورثة بتحليل ناتج ا لـ بي سي أر من الـ دنا المتمم والمحضر من نسخة الـ رنا الرسول.

١.٣. ٤.١.٤.٤. ا لـ بي سي أر المعشش: Nested PCR

ا لـ بي سي أر المعشش طريقة مفيدة للتغلب على بعض المشاكل المترافقة مع العدد الكبير من دورات ا لـ بي سي أر والتي يمكن أن تؤدي إلى تصنيع محمل بالأخطاء. هذه التقنية تزيد بشكل كبير كلا من حساسية وموثوقية بروتوكول ا لـ بي سي أر الأساسي. انها تشمل استخدام مجموعتين من البادئات. المجموعة الأولى خارجية تعطي ناتج بي سي أر طبيعي. بعدئذ، تستخدم بادئات تقع داخل المجموعة الأولى وذلك من أجل تفاعل ثاني للـ بي سي أر. هذه البادئات الداخلية أو المعششة تعطي ناتج أقصر (Querci *et al*, 2006).

١.٣. ٤.١.٤.٥. الـ بي سي أر شبه الكمي (نقطة النهاية)

يراقب ا لـ بي سي أر التقليدي ناتج ا لـ بي سي أر عند نقطة واحدة في دورة التفاعل قبل طور الاستقرار/ الثبات. وبالتالي يتم التحديد الكمي عند نقطة نهاية تفاعل ا لـ بي سي أر (Peccoud, J. & Jacob, 1999). نظراً لأن علاقة الارتباط بين تركيز الـ دنا و شارة ا لـ بي سي أر ليست خطية في هذا

الطور، ولأن هذه العلاقة ليست ثابتة من دورة إلى أخرى، فان دقة التحليل الكمي باستخدام ا لـ بي سي أر التقليدي محدودة. وبالتالي، فان طريقة الـ بي سي أر التقليدي هي شبه كمية، بينما يوجد طرائق أخرى معتمدة على ا لـ بي سي أر تعتبر كمية (Lubeck, 2001)

١.٣. ٤.١.٤.٦. الـ بي سي أر التقليدي التنافسي شبه الكمي Competitive, conventional PCR

الطريقة الأخرى للتحديد الكمي للكائنات المعدلة وراثياً باستخدام ا لـ بي سي أر التقليدي هي ا لـ بي سي أر التنافسي. في ا لـ بي سي أر التقليدي الكيفي، يصنع الناتج المضخم من زوج البادئات. لكن، في الـ بي سي أر التقليدي التنافسي، فان قطعة دنا صنعية ثانية هي " المنافس" ذات تركيز محدد تضاف إلى مزيج التفاعل وهي لها نفس مواقع الالتحام التي لنفس زوج البادئات، لكنها مختلفة في الحجم. بإجراء سلسلة من

ا لـ بي سي أر ذات تراكيز مختلفة من الـ دنا الصنعي، يصبح ممكناً تحديد الكمية الأولية للدنا الهدف. فإذا كانت نواتج ا لـ بي سي أر ذات كثافة مماثلة كالمكتشفة بالرحلان الكهربائي، عندئذ فان الكمية الأولية للدنا القالب (الأساسي) تساوي الكمية الأولية للـ دنا الصنعي. في الـ بي سي أر التنافسي المضاعف (DC-PCR) يطبق هذا المبدأ مرتان، الأولى للمورثة الأساسية العامة الخاصة بالنوع والمنافس، ومرة ثانية للمورثة الخاصة بالكائن المعدل وراثياً ومنافسه. تتيح النتائج من كلا تفاعلي ا لـ بي سي أر التحديد الكمي للمواد المعدلة وراثياً آخذين بعين الاعتبار كمية الـ دنا الجينومي في العضوية.

الـ بي سي أر التقليدي التنافسي والمضاعف هي طرائق شبه كمية، فهي تتطلب مقياس ذو كمية معروفة من الـ دنا الصنعي. وبالنهاية، فان النتيجة يمكن أن تشير فقط إلى أنها أقل، مساوية أو أعلى من التركيز القياسي

كلا هاتين الطريقتين لهما ميزة واضحة أنهما لا تحتاجان إلى جهاز إضافي في المخبر إذا كان المخبر ينفذ طرائق بي سي أر كمية.

(Hupfer *et al*, 2000; Lubeck, 2003; Holst-Jensen 2001).

١.٣. ٤.١.٤.٧. بي سي أر بالزمن الحقيقي Real-Time PCR

يتيح الـ بي سي أر بالزمن الحقيقي تحديد كمية الـ دنا. يوجد طريقتين أساسيتين للـ بي سي أر بالزمن الحقيقي.

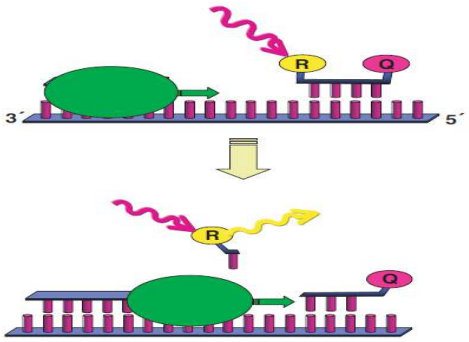
الطريقة الأولى: تستخدم صبغ يتوهج عندما يتداخل مع الـ دنا ثنائي السلسلة، مثال، SYBR green.

عيب هذه الطريقة هو عدم التمييز بين منتج معين و دنا ثنائي السلسلة غير محدد في أنبوب التفاعل.

لذلك، يتم تثبيت تخصصية الـ بي سي أر بالزمن الحقيقي بتحليل مخطط الانصهار (الذوبان أو التفكك)، والتي تفصل المنتجات الجانبية غير المتخصصة الممكن وجودها عن المنتج المعروف المرغوب. ميزة هذه الطريقة هي سهولة تطبيقها وتكلفتها القليلة نسبياً.

الطريقة الثانية: طريقة معتمدة على مسبار تهجين مثل TaqMan® (Roche Molecular systems) ومنارات جزيئية مضيئة (Tyagi and Kramer 1996, Kingsnorth 2003). الميزة الرئيسية لاستخدام المسابر المعلمة بالتوهج بالإضافة إلى البادئات هي التخصصية الفائقة للـ بي سي أر.

يستخدم نظام الكشف بالـ بي سي أر بالزمن الحقيقي TaqMan نوعين من الصبغ ملتحمان مع مسبار واحد (Holland *et al.* 1991). هذا المسبار والذي يتهجن مع ناتج ا لـ بي سي أر المعلم بصبغة مخبرة وصبغة مخمدة (مطفئة)، وتقاربهما يثبط توهج الصبغة المخبرة. بفضل نشاط الاكسونيوكليز للـ تاغ بوليمراز، تحرر الصبغة المخبرة من الصبغة المخمدة أثناء الاستطالة، وتولد بالتالي شارة متوهجة والتي هي متناسبة في كثافتها مع عدد القوالب الموجودة (شكل ٦). الطريقة الأخرى البديلة تتم باستخدام المنارات الجزيئية المضيئة، الاوليغو نيوكليوتيدات ثنائية المعلم والتي تتوهج فقط أثناء التهجين الذاتي .



شكل ٦. مبدأ اختبار النيوكليز (TaqMan). مسبار داخلي معلم بالصبغة المخبرة (R) عند النهاية _5' والصبغة المخمدة (Q) عند النهاية 3' تنشطر بفضل نشاط الاكسونيوكليز للـ تاغ بوليمراز (الحلقة الخضراء) أثناء طور الاستطالة بكل دورة بي سي أر مما يؤدي إلى انبعاث توهج متزايد.

كلا التقنيتين لا تعتمدان على التسلسل وتعتمدان على مسبار التهجين، وتنفذان في جهاز تدوير حراري معدل بحيث أنه قادر على مراقبة شارة التوهج. يراقب تشكل منتجات التضخيم المتوهجة كل دورة مما يتيح تحديد الدورة الحدية (Ct) (دورة العتبة) التي يبدأ فيها أول منتج بالزيادة الأسية. الدورة الحدية متناسبة عكساً مع لوغاريتم عدد النسخ الأولية من الـ دنا المضخم (Kingsnorth 2003).

لذلك، وكما تبين بالتجربة أن تركيز الـ دنا في تفاعل الـ بي سي أر بالزمن الحقيقي متناسب مع عدد دورات الـ بي سي أر أثناء الطور الأسي للتفاعل، فإذا تحدد عدد الدورات التي تستغرقها العينة للوصول إلى نفس النقطة في منحنى نموها (زيادتها) الأسي، فانه ممكن حساب المحتوى الدقيق من الـ دنا المعدل وراثياً. يستخدم الـ بي سي أر بالزمن الحقيقي هذه الأسس لتقديم تقدير كمي دقيق للمحتوى من المادة المعدلة وراثياً. تشمل كل سلسلة من التحاليل تحليل مجموعة كاملة من المقاييس للحصول على المنحنى القياسي. تقارن النتائج الحاصل عليها للعينات الافرادية غير المعروفة بالمنحنى القياسي لتحديد المحتوى من المادة المعدلة وراثياً من تلك العينات غير المعروفة (Lubeck 2003, Holst-Jensen 2001, Vaitilingom *et al.* 1999).

في العينة المختبرة، التسلسل المرجعي الداخلي و الـ دنا المعدل وراثياً تحدد كمياتها بشكل منفصل. الـ دنا المعدل بعدئذ يتم التعبير عنه كنسبة مقارنة بالتسلسل المرجعي.

الطريقة النموذجية للتحديد الكمي التي تنفذ في مخابر تحليل المواد المعدلة وراثياً تستخدم مجموعة واحدة أو أكثر من البادئات واسعة الطيف والتي تميز العناصر المهندسة وراثياً الشائعة الاستخدام مثل المحفز 35S والمنهي nos أو أحد المورثات المدخلة. لكن، من جهة ثانية، نظراً لأن المحاصيل المهندسة وراثياً تحتوي هذه العناصر الشائعة في أعداد متنوعة، فان التحديد الدقيق لنسبة المادة المعدلة وراثياً لا يمكن تحقيقه بالاعتماد على تحليل هذه العناصر الشائعة. محاصيل ذرة مختلفة ربما تحتوي من ١ إلى ٤ نسخ من المحفز 35S والتحديد الكمي بالاعتماد على هذا التسلسل يمكن بذلك أن يعطي تقييم زائد لنسبة المادة المعدلة وراثياً في العينة. لذلك، التحديد الكمي الخاص بمحصول ما معدل وراثياً يقدم ليس فقط نتائج أكثر دقة فيما يخص نوع ونسبة المادة المعدلة وراثياً، إنما يعطي أيضاً نتائج كمية أكثر دقة (Lubeck 2003).

بالخلاصة، يمكن الـ بي سي أر بالزمن الحقيقي من التحليل الكيفي والكمي خلال فترة قصيرة من الزمن بحساسية ومخرجات عالية ويقلل إلى الحد الأدنى الإجراءات غير الضرورية التي تلي ا لـ بي سي أر. فقط بالاقتران مع جمع ومعاملة العينة بشكل مثالي واستخلاص الـ دنا الخالي من التلوث وإتباع الطرائق المناسبة للـ بي سي أر بالزمن الحقيقي، يمكن تقديم التفسيرات الصحيحة الموثقة على أساس هذه الاختبارات الحساسة جداً (Klaften *et al.* 2004). هناك تقارير عديدة متوفرة فيما يخص الإطار الواسع والمواد المرجعية والتوصيات المختلفة لكشف المواد المعدلة وراثياً بواسطة الـ بي سي أر بالزمن الحقيقي.

(Terry, Shanahan *et al.* 2002; Taverniers *et al.* 2004, 2005). لكن، من جهة ثانية، سيبقى التحديد الكمي المطلق لقطع المورثات باستخدام ا لـ بي سي أر التحدي الذي يعتمد بشكل كبير على

التقنية المطبقة والسوفت- (البرامج) والهارد- وير المستخدمة، وأخيراً على توفر مقاييس المعايرة بشكل دقيق جداً لكل تعديل وراثي.

(Giulietti *et al.,* 2001; Huebner *et al*., 2001; Siesler *et al*., 2000; Lubeck, 2001; Bonfini *et al*., 2002 and Querci *et al*., 2006; Terry and Harris, 2001; Terry *et al*., 2002).

اعتبارات هامة للمعلوماتية الحيوية

بدون دعم كاف من المعلوماتية الحيوية، لا يمكن التوصل إلى استنتاجات موثقة وقرار نهائي حول وجود المواد المعدلة وراثياً في الغذاء. إن توفر البرامج (سوفت وير) القيمة وبيانات المورثات والمتطلبات الإحصائية والإجراءات الاعتيادية يجب أن تدرس عند توليد ومعالجة نتائج ا لـ بي سي ر. وقد ثبت بالخبرة أنه ليس كل نواتج تضخيم الـ دنا (أمبليكون) المختارة سوف تعطي نتائج اختبار جيدة، وبالتالي، التأكيد على أهمية البحث الأولي عن أكثر أمبيلكون مناسب وتركيبات مسابر مناسبة. هناك مجموعات سوفت وير عديدة متوفرة والتي تدعم اختيار البادئ و/أو المسبار والبحث عن التماثل في قاعدة بيانات المورثات

(HUSAR, EMBL-EBI). يمكن النجاح في كل من التنبؤات التخصصية النظرية والعملية من تنفيذ مراقبة المواد المعدلة وراثياً بوساطة ا لـ بي سي أر. يجب توضيح المتطلبات عند إجراء التحديد الكمي النسبي والمطلق باستخدام الـ بي سي أر بالزمن الحقيقي أخذين بعين الاعتبار المزايا والمساوئ التي أشار لها Wong and Medrano (2005) . وربما تظهر مشاكل إضافية في تحديد الكميات بسبب تغير مكافئات الجينوم في الأنسجة المختلفة المعدلة وراثياً (مثلاً، محاصيل معدلة وراثيا أبوية مقابل أموية التي وصفها Yoshimura *et al.* 2005 أو الكلوروبلاست المضاعف مقابل عدد نسخ مورثة نووية واحدة)، لكن الـ دنا الملوث يجب أيضاً أن يؤخذ بالاعتبار. العدد المطلق لجزيئات الـ دنا الخاص بالمواد المعدلة وراثياً يجب أن يتجاوز ٢٠ نسخة في العزلة للحصول على احتمالية إحصائية جيدة (Kay and Van den Eede 2001). الهدف الهام هو تنفيذ تحليل وتفسير موثوق لبيانات ا لـ بي سي أر الكمية الناتجة (Burns *et al.* 2004). ونتيجة لذلك، وضع المعايير القياسية لتحليل المواد المعدلة وراثياً باستخدام ا لـ بي سي أر تمت مناقشتها بشكل مسهب وتجارب دولية عديدة منشورة (Roseboro 2000, Popping 2001, Anklam *et al.* 2002) مع حدود مقبولة للكشف والتي تخدم المتطلبات التنظيمية والتشريعية للسلطات المسؤولة (Huebner *et al.* 2001, Einspanier 2001a).

٣.١. ٤.١.٥. تقنيات كشف دنا بديلة

بالإضافة إلى تقنيات الـ بي سي أر الموصوفة أعلاه، فقد تم تطوير طرائق بديلة عديدة لكشف الـ دنا والمعتمدة على ازدياد الـ دنا. تطورات تكنولوجية جديدة ربما تؤدي إلى مجموعة جديدة من الحموض النووية المعلمة و/أو طرائق كشف، وذلك بالاستفادة من الحساسات الالكتروكيميائية وجزيئات النانو، وأجهزة التدفق الدقيقة أو هذه الطرائق الفريدة.

من بين هذه الطرائق، هناك عدد من الطرائق التي لا تعتمد على ا لـ بي سي أر تم وصفها لتضخيم الحموض النووية. إنها تعتمد بشكل أساسي على التضخيم المعتمد على البادئ، وتغييرات تتضمن مضاعفة وكشف قطع المورثة موصوفة أدناه. على الرغم من أن بعض تقنيات كشف الـ دنا هذه حالياً محدودة فيما يخص تحليل المواد المعدلة وراثياً، فان التطورات المستقبلية سوف توسع بلا شك من حيوية هذه التقنيات. الجمع الذكي مع تقنية ا لـ بي سي أر والطرائق المختلفة الموصوفة أدناه يجب لذلك أن تعتبر كونها ذات إمكانية كبيرة كما هو مبين مثلاً في المصفوفات الدقيقة والنانوتكنولوجي.

(Carpini *et al*., 2004; Obeid *et al*., 2004; Jain, 2005; Kalogianni *et al.,* 2006 and Kim *et al.,* 2005).

٣.١. ٤.١.٥. ١. تهجين لطخة ساوثرن/ التشرب البقعي لـ ساوثرن/سذرن Southern Blot Hybridization

لتحديد القطعة التي تحتوي المورثة المرغوبة، يستخدم مسبار دنا متخصص مثل منطقة صغيرة من المورثة المرغوبة للتهجين مع قطع الـ دنا. في منتصف السبعينات، طور ادوارد ساوثرن تقنية بسيطة سماها تلطيخ ساوثرن والتي تنقل بها قطع تحديد دناوية التي تم تجزيئها بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز من الهلامة إلى غشاء خاص (نتروسللوز)، ثم تكشف كحزم/ عصابات بعد التهجين إلى مسبار الـ دنا المتمم. خلال لطخة ساوثرن، قطع الـ دنا هذه تفكك بالمحلول الواقي القلوي (pH عالية) والسلاسل الوحيدة تنقل إلى غشاء نايلون أو غشاء نتروسللوزي قطع بحجم هلامة الأغاروز. يتم عمل سندويش: يوضع الغشاء على الهلامة ومحارم ورقية تكدس فوق الغشاء. تحليل لطخة ساوثرن تتطلب عزل 3 µg دنا لكل حفرة /عينة ويعطي عدد النسخ المدخلة وما إذا تسلسل الناقل موجود أم لا. على الرغم من أنه ليس أساسياً، هذا يحدد الكائن المهندس وراثياً الذي يملك عدد نسخ عالي من البلاسميد المدخل والذي يمكن أن يمثل صعوبات في تحليل النمط الظاهري. يهضم الـ دنا الجينومي بأنزيم محدد أخر والقطع الناتجة تفصل حسب حجمها بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز. يفكك الـ دنا في مكانه وينقل من الهلامة إلى الغشاء. الغشاء الذي نقل إليه الدنا من الهلامة يمكن عندئذ أن يستخدم لتفاعل التهجين المعلم /الموسوم. يوجد طريقتان لكشف تسلسل الحمض النووي، مشعة وغير مشعة من

أجل تعليم الحموض النووية التي ستستخدم كمسابر لكشف تسلسل الحمض النووي (Barnum 1998, Chawla 2002, Grandillo and Fulton 2002, Knight *et al.* 2002)

١.٣. ٤.١.٥ . ٢. تحديد تسلسل الـ دنا /سلسلة الـ دنا DNA sequencing

تحديد تسلسل الـ دنا تقنية مهمة يتم بواسطتها تحديد التتابع الدقيق للنيوكليوتيدات في قطعة الـ دنا. أصبحت طرائق سلسلة الـ دنا السريعة والفعالة متوفرة في أواخر السبعينات وهذا ما أحدث ثورة في العمل على بنية وتركيب المورثات. هناك تقنيتين مختلفتين تم تطويرهما بشكل متزامن من قبل كل من Maxam and Gilbert في هارفارد (Maxam and Gilbert, 1977) و Sanger-Coulson في كامبردج (Sanger et al., 1977).

١.٣. ٤.١.٥. ٣. المصفوفات/ الرقائق الدقيقة للـ دنا (تكنولوجيا مصفوفات/صفائف الـ دنا)

DNA Microarrays (DNA chip-technology)

أدت الحاجة لأنظمة تشخيص سريعة وعالية المخرجات إلى تطوير تقنيات تهجين وكشف مصغرة والتي أوجدت مقاييس صناعية جديدة هي المصفوفات الدقيقة. وقد تم تطوير أوليغونيوكليوتيد عالية التخصص مثبتة في مكانها على حوامل مناسبة للفحص المجهري/الميكروسكوبي الدقيق (Southern *et al.* 1992). وهناك تطورات إضافية حالياً تمكن من وضع وصف (بروفيلprofile) لمجال واسع من الحموض النووية الفريدة. لغربلة وتحديد أي مكون معدل وراثياً، تم إدخال مصفوفات دقيقة مطورة حديثاً تمكن من تعريف مواد متنوعة معدلة وراثياً في خطوة واحدة (Aarts *et al.* 2002). تهجين متخصص لعينة دنا معلمة على نيوكليوتيدات مثبتة محددة يقدم معلومات وافرة حول نوعية وتقدير الكمية الأولية للمورثات المهندسة المنقولة المحتملة والتي أغلبها تم تحليله باستخدام شارات مشعة. بإدخال مصفوفات معتمدة على ببتيد الحمض النووي peptide nucleic acid (PNA) ، تم تعريف مزائج بي سي أر متعدد بنجاح على خمسة دنا مختلفة مهندسة وراثياً (Germini *et al.* 2005). حالياً، ترميز مصفوفات الـ دنا الرقيقة تعتمد بشكل رئيسي على الصبغات العضوية (لصاقة / تعليم مشع). هذه الطرائق ربما تعاني من مشاكل تشمل ابيضاض الصورة (زوال لونها)، كفاءة تعليم منخفضة، وبالنتيجة حساسية منخفضة، على الرغم من تطبيق طرائق عديدة كهربائية، أنزيمية ، قوة مسح ميكروسكوبي، الرحلان الكهربائي الشعري، جزيئات نانو، وطرائق كشف بصرية مطورة حديثاً والتي يتم تطبيقها بنجاح للتغلب على مثل هذه المشاكل (Hintsche *et al.* 1997 Zhou and Zhou 2004; Moller *et al.* 2000; Muller *et al.* 2000).

ومن الملاحظ أنه بالمقارنة مع العدد الإجمالي للدراسات المنشورة حديثاً التي أدخلت طرائق للكشف عن المواد المعدلة وراثياً، فان أنظمة المصفوفات الدقيقة المطبقة بشكل تخصصي سوف تلعب دوراً رئيسياً.

الشرائح/ المصفوفات الدقيقة يمكن بناؤها إما بالـ دنا المتمم cDNAs المضخم بالـ بي سي أر أو بالأوليغونيوكليوتيدات (Freeman *et al.* 2000, Moore, *et al.* 2002).

بعض مجموعات مصفوفات المواد المعدلة وراثياً تكشف دنا خاص بالنوع في النباتات والفيروسات لعناصر التركيب الوراثي المستخدمة بشكل عام والتعديلات الوراثية المدخلة بشكل محدد وذلك لتعريف الأصناف النباتية المسموح وغير المسموح بها. على سبيل المثال، نمط مصفوفة المواد المعدلة وراثياً "الأوروبية" تكشف دنا متخصص من الصويا والذرة واللفت الزيتي والرز، (أنواع) فيروس موزاييك القرنبيط والمواد المعدلة وراثياً التالية: الصويا RR، الذرة المقاومة للحشرات Maximizer Bt 176، الذرة Bt11 ، الذرة Yieldgard Mon810 والذرة Bt-Xtra.

بالإضافة إلى ذلك، تسمح مصفوفة المواد المعدلة وراثياً بغربلة كل المواد المعدلة وراثياً التي تحوي المحفز CaMV 35S والمنهي Nos والمورثة bar و المورثة pat.

وقد توسعت تكنولوجيا المصفوفات الدقيقة، حيث ثبت أن المقارنة الكمية للمعطيات ضمن وعبر شريحة المصفوفة الدقيقة صعب. الأسباب الرئيسية لهذا، هو عدم وجود مرجعيات عامة، وتنوع طرائق تحليل المعطيات المستخدمة / قيد الاستعمال.

من حيث المبدأ، تمكن المصفوفات الدقيقة من كشف وتعريف وتحديد كمية أعداد ضخمة من الأصناف المعدلة وراثياً في العينة في اختبار واحد. علاوة على ذلك، هي مرنة جداً، حيث يمكن إدخال الأصناف الجديدة في مخطط الغربلة بإضافة تسلسلات إضافية إلى المصفوفة

(Leimanis *et al*., 2006; Germini *et al*., 2005; Morisset *et al*., 2008; Van Hall *et al*., 2000 and Moore *et al.,* 2002; Moore *et al.* 2002, Lubeck 2003, Van Hall *et al.* 2000).

١.٣. ٤.١.٥. ٤. إجراءات التدوير الحراري

تم إدخال طريقة التفاعل التسلسلي لأنزيم الربط "الليغيز" Ligase chain reactions (LCR) (Barany 1991) لاستخدام إما التضخيم الأسي أو الخطي بالربط المتكافئ لبادئين متجاورين بواسطة أنزيم الليغيز الثابت بالحرارة. الكشف اللاحق بواسطة الـ haptene للاوليغونيوكليوتيد المرتبطة يمكن من تحليل أقل من ١٠٠ جزيء مستهدف (Kratochvil and Laffler 1994). تم وضع طرائق مراقبة موثقة باستخدام الجمع بين الـ PCR و LCR والكشف المناعي المرتبط بالأنزيم (PCR-LCR-EIA) عند اختبار غش منتجات الحليب (Klotz *et al.* 2001). الجمع بين طريقتي

الـ PCR-LCR على شريحة الرقائق الدقيقة قد تم مؤخراً إدخاله بنجاح لكشف خمسة محاصيل مهندسة وراثياً في عينات غذائية (Bordoni *et al.* 2005). هذه التقنية مميزة جداً للتمييز بين الأنماط الوراثية المختلفة باستخدام تبادل قاعدة وحيد، ويمكن أن تكون أكثرها قيمة في غربلة الـ دنا المهندس وراثياً. الاستخدام الآلي الممكن لمثل طرائق الاختبارات المجتمعة هذه لا بد الا وأن يقدم أنظمة توثيق إضافية، والتي تستخدم ليس فقط لطفرة النقطة الوحيدة، وإنما أيضاً للمناطق المعدلة وراثياً ضمن المواد المعدلة وراثياً.

٣.١. ٤.١.٥. ٥. التضخيم الايزوحراري (تضخيم تغيرات الضغط) Isothermic Amplification

تحاكي تقنية التضخيم المعتمد على تسلسل الحمض النووي (NASBA) استراتيجية الفيروسات الرجعية لمكاثرة الـ رنا لتراكم الـ دنا المتمم والـ رنا (Guatelli *et al.* 1990). بعد إدخال تسلسل المحفز T7 الصنعي من خلال البادئ الأول، NASBA تعمل بشكل مستمر بالاستفادة من ميزة طريقة فعل الايزوثرمية للبوليميراز رنا المنفصل عن دنا المحفز T7 مضخماً المورثة المرغوبة حسب ما هي محددة بالبادئات. هذا الإجراء سوف ينجز بالنهاية تضخيم أسي سريع للحمض النووي (١٠١٠ ضعف) خلال ١-٢ ساعة (Malek *et al.* 1994). تقنيات جديدة مماثلة تم إدخالها، على سبيل المثال:

٤- التضخيم المداري المتموج Rolling Cycle Amplification (RCA; Lizardi *et al.* 1998)،

٥- والتضخيم التشعبي Ramification Amplification (RAM; Zhang *et al.* 1998)

٦- وتضخيم استبدال السلسلة Strand-displacement Amplification (SDA)،

كل هذه لها ميزاتها الخاصة في عملية تضخيم الـ دنا أو الـ رنا باستخدام مكاثرة الحمض النووي الايزوثرمي.

٣.١. ٤.١.٥. ٦. تقنيات السوائل الدقيقة وجزئيات النانو Microfluidic and Nanoparticle Techniques

الميكرو والنانو تكنولوجيا حقل جديد من بحوث الـ دنا والذي يمكن أن يسرع ويطور بشكل كبير طرائق كشف فريدة للمواد المعدلة وراثياً. وقد اكتشفت الإمكانيات الكبيرة للنانوتكنولوجيا للتطبيقات الطبية (Jain 2005، دراسة مرجعية نشرها Kubik *et al.* 2005). لذلك يفترض أن تطورين هامين يمكن أن يسرعا من كفاءة كشف المواد المعدلة وراثياً في التطبيقات الروتينية هما:

- جزيئات النانو
- أجهزة السوائل الدقيقة

لقد فتحت أبعاد جديدة في كشف المواد المعدلة وراثياً، ليس فقط الثباتية الفائقة لجزيئات النانو مقارنة بالأصبغة المشعة، وإنما أيضاً بالطرائق المختلفة للكشف (Drummond *et al.* 2003). الكشف الخالي من الإشعاع المناسب لتهجين دنا محدد، يمكن أن يتم بمطياف امتصاص الأشعة تحت الحمراء infrared absorption spectroscopy وطرائق قياس الألوان colorimetric والطرائق اللالكتروكيميائية باستخدام جزيئات النانو الذهبية أو السيلكا أو الكربونية (Moses *et al.* 2004; Zhou and Zhou 2004; Storhoff *et al.* 2004; Wang *et al.* 2003). وقد تم تطوير التطبيق العملي الأول، وهو كشف المواد المعدلة وراثياً باستخدام جزيئات النانو من قبل Kalogiannu *et al.* (2005). كما تم تطوير أنظمة السوائل الدقيقة، والتي تمكن من الكشف والتقدير الكمي للـ دنا والقابل للتكرار (دراسة مرجعية نشرها Auroux *et al.* 2004). على سبيل المثال، أنماط عديدة لتكنولوجيا السوائل الدقيقة "مخبرعلى الشريحة/الرقاقة lab-on-a-chip" متاحة حالياً، ليس فقط لإثبات وللتقدير الكمي المتزامن لناتج الـ بي سي أر(Birch *et al.* 2001)، وإنما أيضاً للتضخيم المضاعف بالـ بي سي أر على الأجهزة الدقيقة (Munchow *et al.* 2005). بتفصيل أكثر، لقد أدخلت أجهزة دقيقة تعمل بشكل عملي بشرائح الرحلان الكهربائي الشعري لكشف المواد المعدلة وراثياً (Kim *et al.* 2005)والتي تمكن من الحصول على تحليل محتوى بنسبة 0.1% مواد معدلة وراثياً، بدءاً فقط من ٢٠ جزيئة قالب (Obeid *et al.* 2005).

يمكن أن تكشف حساسات الانجذابات الألكترونية المبعثرة piezoelectric affinity sensors الوظيفية، والمطورة بشكل خاص، تهجين الـ دنا المعدل وراثياً مباشرة بواسطة الاوليغونيوكليوتيدات المثبتة على سطوح الالكترود المولد لشارات الكترونية مبعثرة (Minunni *et al.* 2001)، وبذلك تشير وبشكل مخصص إلى وجود المورثات المنقولة المهندسة وراثياً. لكن، من أجل حساسية اختبار فعالة، فانه من الضروري عادة التضخيم المسبق للـ دنا الهدف. يمكن أن تقدم تقنيات النانو هذه إطاراً مستقبلياً لكشف وتقدير كمي لـ دنا المواد المعدلة وراثياً بطريقة سريعة ورخيصة على المواد التي في المتناول الممكن التخلص منها، وبالتالي الحد من التلوث العرضي الحرج.

١.٣. ٤.١.٥. ٧. كشف الطيف الكلي للـ دنا Mass Spectrometry (MS) of DNA

يمكن تحليل منتجات ا لـ بي سي أر بسرعة باستخدام الطرائق المعتمدة على كشف الطيف الكلي، على سبيل المثال، electrospray MS أو–MALDI–TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight)،

واللذان كلاهما طور بالأساس لتمكين البحث عن بوليمرات عضوية أخرى، على سبيل المثال بروتينات. حالياً، تميز قطع الـ دنا على أساس كتلتها وشحنتها مما يمكن من تحديد تسلسل قطع

المورثات القصيرة بحجم حوالي ~200 bp (Chapman 1998). تطبيقات هذه التقنية السريعة والحساسة لتسلسلات الـ دنا القصيرة والتغيرات الوراثية في جينوم النبات والفيروس (Amexis et al. 2001)، لا بد إلا وأن تؤدي إلى خفض كبير في زمن التحليل (Larsen *et al.* 2001). أدخلت تقنيات DNA MS بنجاح في الدراسات الطبية، وتمكن الآن من تسريع بحوث الطفرات (دراسة مرجعية نشرها Gut 2004). مقارنة المورثة المنقولة والجينوم التقليدي غير المعدل وراثياً باستخدام مكتبات قطع الجينوم الخاصة بالنوع للمواد المرجعية، يجب أن تمكن من التمييز السريع بين عينات المواد المعدلة وراثياً وعينات المواد غير المعدلة وراثياً. حللت مؤخراً بنجاح، تكرارات الـ دنا القصيرة، باستخدام تقنية الـ MS لأغراض الكشف عن الجرائم (Carey and Mitnik 2002). على الرغم من أن تحليل MS للـ دنا حالياً محدود بسبب الحجم الجزيئي للحموض النووية، فان طرائق الكشف هذه سوف تزداد أهميتها، لأن تطبيقاتها عالية المخرجات أصبحت عامة.

١.٣. ٤.١.٥. ٨. طرائق المراقبة التكميلية بواسطة الفوتونات

تقنية المطياف الضوئي المرتبط بالتوهج Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)، المطورة في منتصف السبعينات، هي الطريقة المختارة لتحليل تركيبات النانو الجزيئية الحيوية. مبدأ الطريقة هو تحليل تذبذبات كثافة التوهج وقد وصفت التقنية كطريقة موثقة وسريعة لكشف منتجات ا لـ بي سي أر (Bjorling *et al.* 1998). من حيث المبدأ، تعتمد تقنية FCS على انحلال التذبذبات الحرارية لجزيء مفرد (أحد الشركاء يجب أن يكون معلماً بالصبغ) بقياس التوهج المرتبط أوتوماتيكيا بتركيز الجزيء. يتميز ا لـ بي سي أر الكمي المعتمد على تقنية FCS بالحساسية وتوفير الوقت والجهد، ومن هنا أصبح هاماً على نحو متزايد للتشخيص المعتمد على كشف جزيء واحد single-molecule detection-based diagnosis (SMDD). وأخيراً، من المرجح جداً، أن طريقة الـ FCS ستستخدم في تنوع واسع من التطبيقات البيولوجية (دارسة مرجعية نشرها Thompson 1991). حديثاً، استخدم ا لـ بي سي أر المعتمد على الـ FCS في تجارب الغربلة التي استخدمت فيها تكتلات بين جزيئية لحموض نووية ممرضة (Walter *et al.* 1996). على أساس البيانات الحديثة لـ SMDD، ولذلك فان طريقة الكشف هذه يجب أن تمكن من تحليل المادة الوراثية، لكن بدون تضخيم مفرط مسبق بالـ بي سي أر (Kinjo and Rigler 1995; Kask *et al.* 1999).

الرنين البلازموني السطحي، Surface Plasmon Resonance (SPR) هو تكنولوجيا فوتونية خالية من التعليم بارزة أخرى مناسبة لمراقبة العلاقات بين الجزيئات في أحجام عينات صغيرة جداً. تمكن هذه الطريقة البصرية من كشف وتحديد كمي للتغيرات في دليل الانعكاس refractive index (RI) في جوار سطح رقاقة حساس والتي ثبتت إليها المربوطات ligands، مما يمكن من كشف أي تفاعل للجزيئات الحيوية مع المربوطات (دراسة مرجعية نشرها McDonnell 2001). بشيء من التفصيل، يغطى أحد جوانب موشور زجاجي بطبقة رقيقة جداً من المعدن الذي يلصق به مسبار دنا (مفرد السلسلة). عندما يجتاز الشعاع الضوئي الموشور، تتفاعل طاقة الأشعة مع سحابة الالكترونات في الفيلم المعدني، مسببة تذبذب الالكترونات (= بلازمون) (Alberts *et al.* 2002). انعكاس الشعاع يحدث بزاوية رنين معينة. عندما يرتبط الـ دنا بالفيلم المعدني للمسبار، يتغير تركيب المعقد الجزئيي على السطح المعدني مسبباً بذلك تغيراً في زاوية الانعكاس التي تميز كدليل الانعكاس RI. وباستخدام الـ SPR، يمكن تحديد عدد الجزيئات المرتبطة في كل معقد. بالإضافة إلى استخداماتها في الكشف عن جزئيات دنا مختلفة بعد التضخيم بالـ بي سي أر (Kai *et al.* 1999)، حيث تستخدم الطريقة بنجاح لكشف المواد المعدلة وراثياً في عينات الغذاء بعد التضخيم بالـ بي سي أر (Feriotto *et al.* 2002, 2003). الميزة الرئيسية للطريقة، هي أنها يمكن أن تجمع مباشرة مع تكنولوجيا الحساس الحيوي المصغر التي يمكن بها قياس الـ دنا المراد صنعه بدون تعليم مسبق للمسبار، وبطريقة تدفق مستمرة قابلة لإعادة لاستعمال.

٣.١. ٤.١.٥. ٩. طرائق مراقبة بيولوجية فريدة Novel Biological Monitoring Approaches

بالإضافة إلى الطرائق الفيزياكيمائية الموصوفة أعلاه، أدخلت استراتيجيات أخرى لكشف الـ دنا على أساس التأثيرات البيولوجية للمورثات الغريبة داخل العضويات. طورت التقنية التي تستفيد من ميزة تأشيب مماثل يحدث طبيعياً بين قطعتين من الـ دنا متباعدتين لكنهما متماثلتان، وذلك لكشف الأهداف المهندسة وراثياً باستخدام موقع مورثة ميكروبية مصطنعة.

حسب ما يسمى طريقة "استرداد /تحرير الواسم marker rescue "، فان العضويات المحورة التي عاشت أخيراً والتي نميت وكوثرت على أوساط زراعة تشير إلى حدث موجب (أي، عضوية مهندسة وراثياً) (Contente and Dubnau 1979). من حيث المبدأ، تقدم السلالات الطافرة الناقصة التي تحتوي المورثة المرغوبة المماثلة ووسط الانتخاب الذي يمكن أن يعيش فيه فقط النمط البري المتغير إلى حالته السابقة. وبالنتيجة، فان الهدف المعدل وراثياً يمكن كشفه بتأشيب المماثل مع

الطافر الذي يحتوي محفز وظيفي، وهذا يؤدي بعد التأشيب الناجح إلى نمو البكتريا على الوسط الانتخابي. استخدمت هذه التقنية مؤخراً لكشف مورثات المقاومة للمضادات الحيوية الناشئة من المادة الوراثية المعدلة وراثياً (de Vries and Wackernagel 1998). تمت مراقبة الديمومة طويلة الأجل الملحوظة لقطع المورثة الوظيفية الناشئة من الكائنات المعدلة وراثياً في التربة باستخدام هذه التقنية (de Vries *et al.* 2003). في المستقبل، يمكن أن تقود هذه التقنية لكشف الـ دنا المعدل وراثياً من مصادر مختلفة في المحاصيل المحورة وراثياً إلى تطوير طريقة مراقبة بيولوجية مثيرة، والتي تلغى فيها خطوات التضخيم المسبق بالـ بي سي أر.

على العكس من ذلك، ما يسمى "التأثيرات غير المقصودة" يمكن أن تستخدم لكشف التعديل الوراثي مباشرة ضمن الكائنات المعدلة وراثياً. هذه الفكرة الجديدة سوف تذهب بعيداً إلى ما وراء ما هو محسوب بالأصل تعديل وراثي للبحث عن التغيرات غير المتعمدة في نمط التعبير الوراثي (Cellini *et al.* 2004). هذا يعني أن المورثات الغريبة المدخلة ربما تتفاعل من خلال تأثيرات التموضع مع فيزيولوجيا كل مورثة مهندسة وراثياً بالعضوية. لذلك، ربما يحدث تغيرات استقلابية ملحوظة، ويمكن أن تسجل من خلال القياسات التفاضلية لخواص التعبير العشوائي أو نسخ المورثات المميزة. هذا يمكن أن ينطبق على طرائق القطاعات التفاضلية، على سبيل المثال، تقنية ا لـ بي سي أر المعتمدة على DDRT (differential display reverse transcription) المستخدمة لكشف تغيرات أنماط الدنا المتمم cDNA داخل النبات المعدل وراثياً بدون هدف حمض نووي معين. تقنيات الـ دنا عالية القدرات مثل المصفوفات الدقيقة مناسبة فقط عندما يكون معروفاً الجينوم الكامل للعضوية المدلروسة قيد البحث. التغيرات الاستقلابية والبروتينية أيضاً سوف تراقب لتدعم اثبات براهين تلك التحاليل المتكاملة للمواد المعدلة وراثياً.

هناك طرائق جديدة حالياً قيد التطوير لمراقبة مثل هذه التفاعلات، على نقيض التفاعلات الفيزيولوجية التقليدية بعد حدوث عملية نقل المورثة المهندسة وراثياً إلى العضوية التي تم تحويرها (Le Gall *et al.* 2003). وهذا سوف يستدعي تطوير طرائق حساسة، شاملة، عالية القدرات، قادرة على كشف صفات خلوية متعددة، وبالتالي لا بد الا وأن تقود إلى تبصر رهيب بنور التفاعلات البيولوجية المتعددة التي يتوسطها أي تعديل وراثي مرغوب. تحليل الحموض الريبية النووية في الخلية، (RNA) ربما يكون لهذا السبب وسيلة مهمة لكشف فروق التعبير التي تشير إلى تأثيرات التموضع داخل التركيب الوراثي (جينوم) في العضويات المهندسة وراثياً والمورثات النظيرة بالعضوية (ايزوجين isogene).

٣.١. ٤.٢. الطرائق المعتمدة على البروتين Protein-based Methods

تعتمد هذه الطرائق على كشف البروتينات. الكشف البيولوجي المناعي للكلونات التي تصنع بروتين غريب أيضاً كانت ناجحة في الحالات التي تم فيها تعبير تسلسل المورثة المدخلة. تتطلب هذه الطرائق مضاد جسمي خاص. في هذه الطريقة، تنمى الخلايا المحورة على طبق أغار، ويحضر طبق أخر مكرر لأن الإجراءات اللاحقة سوف تقتل هذه المستعمرات. بعدئذ تحل الخلايا البكتيرية لتحرير المضاد الجسمي من الخلايا الموجبة. ينقع فلتر نتروسللوزي المشرب ببقايا التحلل البكتيري في محلول يحوي المضاد الجسمي (غير معلم). يتحد مولد الضد (أنتي جين) مع المضاد الجسمي المرتبط ب IgG. يزال الفلتر ويعرض لـ IgG معلم ب -125I. الآن المركب 125I-IgG، يمكن أن يتفاعل مع مولد الضد المرتبط بواسطة محددات مولدات الضد عند مواقع غير تلك الداخلة في الربط الأولي لمولد الضد بالفلتر المغطى بIgG . تكتشف المستعمرات المتفاعلة ايجابياً بغسيل الفلتر وعمل صورة شعاعية. المستعمرات المطلوبة يمكن عندئذ أن تسترد من الطبق المكرر. في هذه الأيام، يوجد -125I IgG ثانوي، والذي يرتبط تشاركياً بأنزيم يمكن كشف نشاطه بالتشريح الكيميائي (مثلاً، الفوسفاتاز القلوي). مفتاح النجاح هو في نوعية المضاد الجسمي ومن الضروري أن يتعرف المضاد الجسمي بكفاءة على البروتين المتفكك.

تشمل هذه الطرائق ما يلي:

٣.١. ٤.٢. ١. الاليزا: اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم ELISA

تهدف إلى كشف بروتينات معينة في المحصول كنتيجة للتعديل الوراثي. من أجل كشف وجود صفة المقاومة للمبيد العشبي، فان الاليزا تكشف بروتين خاص والذي مسك من قبل المضاد الجسمي المشكل للبروتين. الاليزا سريعة وأقل كلفة من الطرائق المعتمدة على الـ بي سي أر، ويمكن عملها في أي مخبر. هناك شركات عديدة تبيع مجموعات خاصة والتي تستخدم من قبل مخابر الكشف عن المواد المعدلة وراثياً.

٣.١. ٤.٢. ٢. الاختبارات المناعية: لصاقات/شرائط الانسياب الجانبي

على شكل شريطة تغطيس (شرائط انسياب جانبي) يمكن أن تستخدم لكشف العضويات المهندسة وراثياً في الأوراق والبذور والحبوب. شرائط ورقية أو مجاديف بلاستيكية تستخدم لدعم أسر المضاد الجسمي، وهذا هو عندئذ موقع التفاعل. تغطس الشريطة أو المجداف في أنبوبة تحتوي محاليل مختلفة. كل تغطيسة يليها خطوة غسيل. التفاعل النهائي يشمل تغير اللون في الأنبوبة حيث توضع الشريطة أو المجداف. وقد أدت التطورات الحديثة لشكل شريطة التغطيس إلى تقنيات الانسياب الجانبي، حيث تنتقل

مواد التفاعل من خلال قنوات الغشاء بالقوة الشعرية. خطوة واحدة كافية لانجاز الاختباروالشاهد لأداء الكواشف مشتملة في الاختبار. تقرن (تربط) المضادات الجسمية الخاصة بالبروتينات الغريبة بلون الكاشف وتدمج في شريطة الانسياب الجانبي. عندما توضع شريطة الانسياب الجانبي في كمية صغيرة من مستخلص مادة نباتية تحتوي بروتينات غريبة، يحدث ارتباط بين المضاد الجسمي المقترن والبروتين. تتشكل ساندويش مع بعض، لكن ليس كل المضاد الجسمي الذي يقترن بلون الكاشف. الغشاء يحتوي منطقتين للأسر، واحدة تأسر البروتين الغريب المرتبط، والثانية تأسر الكاشف اللوني. مناطق الأسر هذه تظهر لون محمر عندما الساندويش و/أو الكواشف الملونة غير المتفاعلة لا تؤسر في مناطق محددة على الغشاء. يدل وجود خط واحد (خط الشاهد) على الغشاء على عينة سلبية، بينما يدل وجود خطان على عينة موجبة. تقنيات الانسياب الجانبي هي كيفية وشبه كمية. بإتباع إجراءات أخذ عينات مناسبة، فانه ممكن الحصول على مستوى ثقة 99% أو أقل من 0.15% مواد معدلة وراثياً بالنسبة للمجموعة المختبرة.

يوجد مصادر تجارية عديدة لـ كيتات اختبارات كل من الايزا و شرائط التغطيس. من الضروري تذكر أن الاليزا و شرائط الانسياب الجانبي هي خاصة بالصفة، وبالتالي لا يمكن أن تعرف الكائن المعدل وراثياً، حيث أن أصناف عديدة يمكن أن تملك نفس الصفة المدمجة. لذلك، الاختبارات المناعية عموماً لا تعتبر كطريقة غربلة. ونظراً لأن نفس البروتين الهدف يمكن أن يتواجد في كائنات معدلة وراثياً مختلفة، فان الاختبارات المعتمدة على المضادات الجسمية لا يمكن أن تكون مميزة (على سبيل المثال، أصناف الذرة Bt-176, BtII وMon810 تحتوي نفس البروتين Cry).

علاوة على ذلك، الاختبارات المناعية تبرز بعض المشاكل: لا تعمل على البروتين المتفكك، ونمط محدد من البروتين أو الصنف يجب أن يكون معلوماً ويتم التعبيرعنه عند أخذ العينة. وعلاوة على ذلك، البروتينات الغريبة يمكن أن تتباين في مستويات التعبير في الأنسجة النباتية المختلفة، مما يجعل التحديد الكمي صعباً

(Lubeck 2003, Holst-Jensen 2001, Querci *et al.* 2006)

٣.١. ٤.٢. ٣. لطخة وسترن Western. هي طريقة للاختبار الكيفي وشبه الكمي للبروتينات. إنها مناسبة أكثر للبحوث منها للتفتيش. وهي تستخدم للبروتينات الذوابة بشكل ضعيف. إنها تشمل نقل جزيئات البروتينات المفصولة بالرحلان الكهربائي إلى الأغشية. الغشاء غالبا يسبر (يعلم) بالمضاد الجسمي لكشف البروتين المقصود بطريقة تماثل الغربلة المناعية (Nicholl 2002).

١.٣. ٤.٢. ٤. استخدام الركائز المولدة للون / الاختبارات الكيماوية التشريحية

The use of chromogenic substrates /histochemical assays

إن استخدام الركائز المولدة للون في طرائق الغربلة الوراثية هو جانب مهم لتطور التكنولوجيا. أكثر النظم الشائعة تستخدم المركب X-gal (5- bromo-4-chloro - 3- indolyl- B-D-galactopyranoside) وهو ركيزة بدون لون للبيتا غالاكتوزيداز B-galactosidase. الأنزيم عادة تصنعه خلايا الايشريشيا كولاي عندما يصبح اللاكتوز متاحاً. لكن، التخليق يمكن أيضا أن يحدث إذا استخدم نظير اللاكتوز مثل IPTG (iso-propyl-thiogalactoside). وهذا له ميزة كونه محرض دون كونه ركيزة لـ بيتاغالاكتوزيداز. عند انقسام X-gal، يتشكل منتج أزرق اللون، وبذلك يمكن كشف تعبير المورثة LacZ (B-galactosidase) بسهولة. وهذا يمكن أن يستخدم إما كطريقة غربلة للخلايا أو للصفيحة أو كطريقة لكشف تعبير المورثة خاص بالنسيج في النباتات المهندسة وراثياً.

المورثات المخبرة وسيلة هامة في البحوث النباتية. إنها تستخدم بشكل شائع جداً لدراسة نشاط /فعالية العناصرالمنظمة مثل المحفزات والمنشطات/المعززات والانترونات ومنهيات النسخ. نشاط المورثة بيتاغلوكورونيديز (GUS) يمكن أن يقاس بسهولة وتحدد كميته بطرائق المطياف الضوئي والفلورومتر. التموضع في نسيج محدد للمورثة GUS يمكن مشاهدته بالاختبار الكيميائي التشريحي histochemical.

يتم التفاعل الكيميائي الذي يتيح الكشف الكيميائي التشريحي في الأنسجة النباتية لنشاط المورثة بيتاغلوكورونيديز (GUS) على خطوتين: تحفز بيتاغلوكورونيديز حلمهة المادة X-Gluc وتحرر جزيء ٥- برومو-٤- كلورو-اندوكسيل 5-bromo-4-chloro-indoxyl عديم اللون. يخضع الاندوكسيل إلى أكسدة ثنائية والتي تؤدي إلى التلون الأزرق. يحفز التثاني dimerization بالأوكسجين الجوي ويمكن تعزيزه باستخدام محفز أكسدة، مثل مزيج البوتاسيوم فيري سيانيد والبوتاسيوم فيروسيانيد. هذا المزيج أيضاً هام في الاختبار الكيميائي التشريحي، لأنه يبطئ انتشار الاندوكسيل إلى الخلايا المجاورة والذي يعتبر مصدراً قويا من صنع الإنسان في هذا الاختبار. مزيج البوتاسيوم فيري سيانيد والبوتاسيوم فيروسيانيد يمنع انتشار الاندوكسيل بتعزيز التثاني (Falciatore *et al.* 2002).

٣.١. ٣.٤. الاختبارات الحيوية للمبيد العشبي

الاختبارات الحيوية للمبيد العشبي رخيصة ودقيقة جداً في تعريف العضويات المهندسة وراثياً لصفة محددة في العينات ذات البذور أو الحبوب الحية. اختبار البذور افرادياً يؤدي إلى التحليل الكمي لمستوى الكائن المعدل وراثياً، عادة تختبر حوالي ٤٠٠ بذرة بكل عينة. الدقة تعتمد على الإنبات، فكلما كان الإنبات أعلى كلما كان مستوى الثقة أعلى في الاختبار. فقط البذور أو الحبوب الحية يمكن اختبارها (ليس منتجات مصنعة) وكل اختبار يتطلب سبعة أيام لإكماله. يزداد الخطأ المحتمل للدقة كلما نقص مستوى إنبات العينة. علاوة على ذلك، الاختبارات الحيوية تتطلب اختبارات منفصلة لكل صفة مختبرة، وحالياً الاختبارات لا تكشف صفات تحمل غير المبيدات العشبية. لذلك، فان الاختبارات ذات قيمة محدودة لسلطات التفتيش. الاختبارالحيوي للمبيد العشبي هو اختبار كفاءة ينجز على النباتات أو البذور التي تغربل لتحمل مبيد عشبي معين. تعرض النباتات /البذور للمبيد العشبي، وبعد فترة من زمن النمو تقيم كمتحملة و حساسة. بينما ا لـ بي سي أر ينظر لوجود الـ دنا المرغوب والاليزا تبحث عن البروتين المشفر بذاك الـ دنا والاختبار الحيوي يحدد التأثير الفعلي أو نشاط/ فعالية المورثة في النبات الحي. يتطلب الاختبار الحيوي النموذجي أدوات متخصصة أقل من الاختبارات الوراثية الأخرى، ويمكن إدخاله بسهولة إلى مخابر البذور التقليدية. وتشمل طرائق الاختبارات الحيوية القياسية للمبيدات العشبية: تشرب/امتصاص الركيزة، النقع المسبق أو رش البادرات.

المحاصيل المتحملة للمبيدات العشبية: نباتات المحاصيل المزروعة لتي عدلت لتكون قادرة على العيش عند رش واحد أو أكثر من المبيدات العشبية وذلك بإدماج مورثات معينة من خلال إما الهندسة الوراثية أو تقنيات التربية التقليدية. على سبيل المثال، تم إدخال المورثة CP4 EPSPS بالهندسة الوراثية إلى المحاصيل (مثلاً فول الصويا، الكانولا، القطن، الذرة، الخ) لجعلها متحملة للمبيد العشبي غليفوسات. الذرة أيضاً حورت بالمورثة PAT لكي تمللك صفة المقاومة للمبيد العشبي غليفوسات. سلالات ذرة أخرى تحمل المورثات IT أو IR هي متحملة للمبيد العشبي imidazolinone. التحمل للمبيد العشبي imidazolinone تم تطويرها بوساطة تقنيات التربية التقليدية (Adrian *et al.* 2003, Lubeck 2001).

الاستنتاجات والرؤيا المستقبلية للكشف عن المواد المعدلة وراثياً بوساطة تحليل الـ دنا

Conclusions and Future Prospects for GMO Detection by DNA Analysis

تم خلال العقد الماضي تطوير مجموعة من الطرائق العامة الشاملة والموثقة بالاعتماد على كشف بقايا الـ دنا وذلك لغربلة تحديد كميات المواد المعدلة وراثياً في الغذاء أو المواد الغذائية. متطلبات واسعة للبحث عن كميات الـ دنا في المواد المعدلة وراثياً في مواد عينات متنوعة حسب ما هو محدد في أغلب القوانين أو التنظيمات التشريعية هي حالياً مرضية حصرياً باستخدام طرائق ا لـ بي سي أر. تقنيات التوصيف البديلة لمقارنة المواد المعدلة وراثياً افرادياً مع نظائرها غير المعدلة وراثياً، ربما تصبح لذلك مركز النشاط المستقبلي، وخصوصاً من أجل تقييم سلامة الأغذية والأعلاف الناتجة من المواد المعدلة وراثياً (Kuiper *et al.* 2003). انه من الواضح أن الـ دنا هو الجزيء المثالي لتأسيس طرائق عالمية لغربلة وتحديد كمي للمواد المعدلة وراثياً والتي تؤدي إلى شهادة موثقة، على الرغم من أن تطوير مثل هذه التقنيات الكلية يعوقها الشك والعدد المتزايد من التعديلات الوراثية في المواد المعدلة وراثياً المحررة. التحضير للتطورات المستقبلية لمنتجات المواد المعدلة وراثياً التجارية من أعلاف الحيوانات، يجب أيضاً أن تؤخذ بعين الاعتبار عند محاولة إثبات وجود أثار دنا مؤشب ناتج من الأعلاف المهندسة ورثياً (Einspanier *et al.* 2001b; Klotz *et al.* 2002).

وأخيراً، يجب أن تمكن الأبحاث الجارية من تطوير تقنيات لكشف أثار المواد المعدلة وراثيا على أساس طرائق الـ دنا.

الملخص. تتميز التقنيات المعتمدة على الـ دنا بحساسيتها العالية وقوتها والانجاز السريع، بحيث يتم اتخاذ الاحتياطات والشروط المسبقة والتصميم التجريبي الدقيق لتجنب وتفادي النتائج السلبية الخاطئة أو الموجبة الخاطئة. حالياً، يبدو أن ا لـ بي سي أر بالزمن الحقيقي أفضل وأنسب نظام تم تطويره لمراقبة الكائنات المعدلة وراثياً ويقدم كشف سريع ، حساس جداً، نوعي وكمي موثوق.

مع أن الطرائق ذات العلاقة توضح عمليات إنتاج الغذاء فيما يخص مكونات المواد المعدلة وراثياً، فان الدنا الطبيعي موجود عملياً في كل مكونات الغذاء اليومي وأي مخاوف للسمية من الدنا الموجود في الغذاء مستبعدة. على هذا الأساس، تمت مناقشة عدد من اعتبارات سلامة الـ دنا المهندس وراثياً (Jonas *et al.* 2001) والتي تحوز دائما على الاهتمام العلمي.

بالإضافة إلى ذلك، لا تستخدم طرائق الاختبار المطورة فقط لكشف الدنا المعدل وراثياً، إنما أيضاً لاختبار قوتها البيولوجية فيما يخص التفاعلات البيئية المحتملة. في هذا السياق، الانتقال الأفقي للمورثات من الكائنات المعدلة وراثياً إلى بكتريا الأمعاء مثلاً لا يزال موضع جدل ومناقشات علمية

جارية. تقدم مشاريع البحوث الأوروبية التي تعالج هذا الموضوع بشكل موسع، نتائج تقييم مخاطر وافية للتوعية الشعبية (van den Eede *et al.* 2004). وسوف تمكن البحوث حول مصير قطع مورثات المواد المعدلة وراثياً وتأثيراتها البيولوجية باستخدام تكنولوجيا الـ دنا الجديدة من تقييم مستدام لمخاطر الغذاء والأعلاف المهندسة وراثياً.

ومن المتوقع أن سرعة وحساسية طرائق الكشف المعتمدة على الـ دنا المستخدمة لتعريف محتوى الغذاء من المواد المعدلة ورثياً سوف تصبح نظراً لمرونتها واقتصاديتها الطريقة المفضلة للغربلة والتحديد الكمي. ويجب الانتباه بشكل خاص عند حساب الكميات المطلقة لأجزاء الـ دنا الخاصة بالمواد المعدلة وراثياً بما يخص تباين العينات. على سبيل المثال، تغيير عدد النسخ الطبيعية بالمورثات الهدف في النواة مقارنة بالمورثات في الميتوكوندريا أو الكلوروبلاست. ينجز التحديد الكمي الروتيني للمواد المعدلة وراثياً في الغذاء أو المواد الغذائية حالياً بشكل موثوق فقط في المخابر المتخصصة، باستخدام إجراءات قياسية ومضبوطة بشكل كبير. أنظمة/ طرائق الاختبارات المعتمدة على الـ دنا هذه لا تزال مكلفة، وتتطلب أجهزة مخبرية معقدة للتشغيل. لكن، ربما تقود التطورات المستقبلية إلى تطوير طرائق بسيطة وأقل كلفة لغربلة الـ دنا حسب احتياجات ومتطلبات السوق، وخصوصاً على خلفية التوفر التجاري لأعداد متزايدة بشكل كبير من المواد المختلفة المعدلة وراثياً. وهذا ربما يتطلب استخدام كيتات شرائط اختبار سريعة لإجراءات الغربلة الأولية، والتي ستخفف العبء على الميزانية الحكومية المحدودة نوعاً ما لمراقبة الغذاء. أخيراً، الميزة الأكثر اقناعاً للطرائق المعتمدة على الـ دنا لكشف المواد المعدلة وراثياً تبقى الطبيعة القوية للـ دنا في إجراءات تحطيم العينة العديدة، معاً مع احتمالية تضخيم الشارة الكبير خلال زمن قصير عندما يكون الـ دنا موجوداً في العينة المختبرة.

في المستقبل، سوف يستمر تحليل المواد المعدلة ورثياً باستخدام تكنولوجيا الـ دنا في التطور، وبالجمع مع تقنيات جديدة أخرى، على سبيل المثال، أنظمة المكرو والـ نانو، سوف تمكن من تحليل سريع ومرضي للمتطلبات الضخمة لمراقبة الغذاء.

الجـــزء الثاني

دليـــــل المستخدم العمـــلي حــول الكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً والأمان الحيوي

٢-١- قواعد الأمان الحيوي المخبرية

يطبق في المخابر كافةً، نظام الممارسات المخبرية الجيدة (**Good Laboratory Practices GLP**) **التالي:**

١. يجب إعطاء المخبريين التعليمات اللازمة عن الإجراءات المتبعة في المخابر.
٢. عدم المص المباشر بواسطة الفم للسوائل السامة أو الخامجة، بل يجب استعمال الممص.
٣. عدم نفخ السوائل المعدية خارج الممص.
٤. عدم خلط مزيج من المواد المعدية بصنع فقاعات بواسطة نفخ الهواء بالممص.
٥. تجنب استعمال المحاقن قدر الإمكان.
٦. تعقيم الممص والمحاقن المستعملة في نفس الوعاء الذي استخدمت فيه بعد الاستعمال الأول.
٧. يجب فحص أنابيب التثفيل قبل عملية التثفيل خوفاً من وجود شقوق أو كسور فيها.
٨. استعمال أنابيب تثفيل ذات أغطية محكمة الإغلاق.
٩. تجنب صب السائل من أنابيب التثفيل، وإذا كان ذلك ضرورياً، يجب مسح حافة الأنبوب بسائل معقم. تجنب ملء أنابيب التثفيل إلى الحافة، حيث تصبح الحواف ملوثة بمحتويات الأنبوب.
١٠. تعقيم كل المواد الملوثة قبل التخلص منها.
١١. تعقيم أسطح العمل باستعمال الصابون والكحول بعد نهاية كل يوم عمل.
١٢. المحافظة على الأيدي بعيدة عن الأنف، العين والوجه لمنع العدوى الشخصية.
١٣. وجوب غسل الأيدي عندما يكون هناك شك بالتلوث عند التعامل مع مواد حية وقبل مغادرة المخبر، يجب توفر مغسلة واحدة على الأقل خاصة بالأيدي.
١٤. تجنب الأكل والشرب ومضغ العلكة وتخزين الطعام والتدخين ووضع مستحضرات التجميل في المخبر.
١٥. القيام بتدابير وقائية خاصة في حال تلوث المجاري الفموية أو التنفسية بمواد معدية.
١٦. ارتداء المعاطف المخبرية إلزامي، ويجب أن تخلع عند الخروج من المخبر.
١٧. ارتداء الملابس المخبرية النظيفة فقط في حجرة الطعام والمكتبة والمناطق غير المخبرية.
١٨. يتوجب تعقيم المهملات بالحرق أو بالتعقيم الحراري (بالأوتوكلاف).

١٩. تجنب التماس مع الأحياء المحورة وراثياً والعوامل البيولوجية الخارجية، ويتم إحراق القفازات المستعملة.

٢٠. يجب أن يكون باب المخبر مغلقاً طوال الوقت.

٢١. يجب أن يتم التعامل مع الكيماويات المنتجة للأبخرة تحت ساحبة الهواء.

٢٢. تعلق لافتات التحذير ضد الخطورة الحيوية في المخبر وبشكل إلزامي.

٢٣. يتوجب نقل المواد المتوجب حرقها أو تعقيمها بالحرارة داخل حاويات غير نفوذة.

٢٤. يتوجب توفر المعقمات الفعالة من أجل التعقيم الروتيني والاستعمال الآني عند حدوث انسكاب للمواد.

٢٥. يسمى مسؤول عن أمان كل مخبر لمتابعة تنفيذ إجراءات الممارسات الجيدة والتقيد بها.

الممارسات وتعليمات السلامة الحيوية في المخابر

١. كن صبوراً أثناء العمل. لاتبدأ أي تجربة ما لم تكن متأكداً من كل الخطوات.
٢. لا تستخدم أي آلة ما لم تكن متأكدا من كيفية الاستخدام. استخدم الأجهزة بالشكل المناسب. إذا كنت لا تعرف كيفية الاستخدام، عد إلى دليل نشرة الاستخدام أو اسأل الأخرين.
٣. لا تلمس أو تضع أي جهاز بكفوف ملوثة.
٤. إذا سكبت أو لوثت بأي مادة سامة أو مسرطنة أو مضاد حيوي، طهر المنطقة الملوثة أو الجهاز الملوث فوراً. إذا كنت لا تعرف كيف تنظفها/ تطهرها، أسأل الأخرين أو انظر في صفحة بيانات السلامة الخاصة بالمادة Material safety Data sheet (MSDS)
٥. البس كفوف بلاستيكية ومعطف مخبري أثناء التعامل مع مواد سامة أو مسرطنة (مثل ايثيديوم بروميد، فينول، كلوريد السيزيوم...الخ).
٦. البس كفوف بلاستيكية ومعطف مخبري أثناء التعامل مع مواد سامة أو مسرطنة (مثل ايثيديوم بروميد، فينول،...الخ).
٧. البس واقي للعين أو للوجه عند استخدام أشعة فوق بنفسجية.
٨. إذا تلوث الجسم أو الملابس بالمواد الكيماوية أو المضادات الحيوية أو المسرطنة، مباشرة اخلع الملابس الملوثة واغسل التطرشات الصغيرة تحت الماء لمدة خمس دقائق على الأقل. التطرشات على الأرجل يمكن غسلها في المغسلة. لا تتردد باستخدام الدوش في المخبر عند التطرش كثيراً. لا تغسل الجلد الملوث بالكحول.
٩. بعد استخدامك لأي مادة كيميائية أو أنزيم أو مادة مذيبة...، أعدها إلى مكانها.
١٠. قبل أن تستخدم البقايا الأخيرة من أي مادة، اطلب شراء المادة الضرورية.
١١. معظم الأنزيمات غالية الثمن. احفظها في -٢٠° م. احسب الكمية التي تريدها وخذها حسب الحجم المناسب لك من المجمدة.
١٢. استخدم رأس ماصة جديد لإزالة الكمية الضرورية من الأنزيم.
١٣. الأجهزة المخبرية أيضا غالية الثمن، وأحيانا خطرة (جهاز الطرد المركزي).
١٤. لا تستخدم أي جهاز لا تعرفه ما لم تسأل الآخرين.
١٥. الايثيديوم بروميد سام جداً. من المحتمل أن يسبب السرطان، ويجب أن يستخدم بلبس الكفوف البلاستيكية على الدوام. ويجب أن يحصر استخدامه في منطقة مخصصة. وهو يتبخر عندما

يسخن (مثلاً عند صب هلامة الاغاروز). لا يسمح باستخدامه في المطبخ (وعلى الأخص ليس في الميكروويف)، ولا يسمح باستخدامه في مخبر الأنسجة النباتية ولا في مخبر البيولوجيا الجزيئية خارج ساحبة الغازات السامة.

١٦. الأشعة فوق البنفسجية ضارة ومؤذية للعيون والجلد – البس نظارات واقية خاصة لذلك على الدوام عند استخدامك مصدر أشعة فوق بنفسجية

١٧. بالطبع، يجب غسل الأيدي بعد أي عمل في المخبر وخصوصا قبل أكل الطعام.

١٨. يجب على كل العاملين أن يعرفوا إجراءات الاستجابة للطوارئ

١٩. البس نظارات وقفازات واقية والتي تستعمل لمرة واحدة، والبس معطف ذو كم طويل. ومن الأفضل عدم لبس عدسات لاصقة، إنما نظارات.

٢٠. البس نظارات واقية عندما تتعامل مع الآزوت السائل

٢١. يجب على كل العاملين والزوار والطلاب أن يعرفوا أماكن النافورة المقلوبة لغسل العين ودوش الطوارئ .

٢٢. لا يسمح بالأكل والشرب أو التدخين في المخابر، ومخالفة ذلك سوف تعرض المخالف للعقوبة الشديدة والفورية.

٢٣. يجب على النساء الحوامل أن تخبر الشخص المسؤول في حال وجود الحمل .

٢٤. في حالات الطوارئ المستلزمة معالجة طبية، يجب إتباع التعليمات العامة التالية:

- ابق هادئاً.
- إجراء الإسعافات الأولية / الإجراءات المنقذة للحياة إذا لزم الأمر.
- اطلب الطوارئ / الإسعاف فوراً .
- لا تنقل الشخص المصاب ما لم يكن هناك ضرورة ملحة جداً من استمرار الضرر.
- حافظ على الشخص المصاب دافئاً .

٢٥. يتطلب مدى وحجم المادة الخطرة المستخدمة في المخابر التخطيط المسبق لإجراءات الأمان اللازمة الخاصة بالتعرض للمواد الكيماوية.

٢٦. التعرض للمواد البيولوجية خارج حجرة الأمان البيولوجي (جهاز العزل الجرثومي) سوف يولد نوع من الضباب / ايروسول، والذي يمكن أن ينتشر في كامل جو المخبر.

٢٧. البس قفازات واقية والتي تستعمل لمرة واحدة.

٢٨. بلل منديلاً ورقياً بمادة مطهرة وامسح المنطقة الملوثة .

٢٩. ضع المنديل الورقي الذي مسحت به في الكيس البلاستيكي المخصص للنفايات .

٣٠. نظف المنطقة الملوثة بمنديل نظيف مبلل بمادة مطهرة مرة أخرى، ثم جفف المكان بمنديل آخر.

٣١. انتبه واعلم أن الكائنات الحية المهندسة وراثياً يجب ألا تتلامس مع البيئة أبداً، ولذلك لا تسكبها في المغسلة قبل التعقيم بالأتوغلاف.

٣٢. بعض القواعد العامة والهامة:

- لا تركض في المخبر.
- افتح الأبواب بهدوء.
- احمل المواد / المذيبات الكيماوية العضوية في سلة .
- نظف مكان العمل بعد الانتهاء من عملك.
- اتلاف الزجاجيات، سلالات البكتيريا أو المواد الكيماوية يمكن أن يسبب ضرراً ويخرب عمل كل الأشخاص في المخبر لأسابيع طويلة حتى يكشف السبب لذلك:

أ- عندما تزن أي مادة كيماوية، لا تضع أي بقايا في أداة الوزن ثانية في وعائها بل ارمها.

ب- نظف الزجاجيات المستعملة بشكل جيد بعد الاستعمال.

ت- يجب أن تنظف أجهزة الرحلان الكهربائي، قضبان التحريك المغناطيسية وملعقة الوزن مباشرة بعد الانتهاء منها من قبل الشخص المستخدم، أولاً يجب تنظيفها بمسحوق تنظيف ثم بالماء الجاري، ثم بالماء المقطر.

٣٣. للعمل تحت شروط مستوى الأمان الأول، فإنه يجب اتخاذ واتباع تعليمات الأمان الحيوي التالية:

١. لكي تعمل بالعضويات المهندسة وراثياً فإنه يسمح فقط بالعمل في المنطقة المخصصة والتي عليها إشارة مخبر .

٢. حافظ على الأبواب مغلقة.

٣. من أجل سحب المواد الكيماوية السائلة استخدم المساعدات المناسبة، ولا تستخدم السحب بواسطة الفم.

٤. اغسل وطهر يديك بعد الانتهاء من العمل.

٥. حافظ على المخبر مرتباً.

٦. التدخين أو الأكل أو الشرب غير مسموح به في المخبر.

٢.٢. التحوير الوراثي للقمح بوساطة المدفع الجينيي / القصف الحيوي
Biolistic transformation system of wheat

- **المحاليل اللازمة لتحميل الجزيئات:**

- كحول ايثيلي مطلق ١٠٠%.
- ماء مقطر ومعقم.
- DNA : يخفف الـ DNA في محلول الـ TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0) للحصول على تركيز نهائي 1 ميكروغرام/ميكروليتر.
- كلوريد الكالسيوم CaCl2 (٢.٥ مول).

تحل كمية ٣٦.٧٦ غ في ١٠٠ مل ماء مقطر، يعقم المحلول بالفلترة ثم يخزن على درجة حرارة - ٢٠ °م.

- سبيرميدين Spermidine (١٠٠ ميكرومولر)

يحضر بإضافة ١٤ ميكروليتر سبيرميدين أساس حر + ٩٨٦ ميكروليتر ماء مقطر معقم، يخزن المحلول على درجة حرارة - ٢٠ °م لمدة ٣ أشهر كحد أقصى.

- **تحميل الـ DNA على جزيئات التنغستين**

DNA Coating of Tungsten Particles (Maliga Lab, Rutgers University, NJ)

تتميز جزيئات التنغستين بأنها غير منتظمة في الشكل وغير متجانسة في الحجم (تتراوح أبعاده ما بين ٠.٥ – ٢ ميكرومتر) وتتداخل أحجامها بشكل كبير. تتميز جزيئات التنغستين بأنها رخيصة جداً ومتوفرة بأحجام عديدة، وتمثل كل مجموعة من هذه الحجوم مجالاً واسعاً من أقطار الجزيئات التي يمكن تحميلها بسهولة بالـ DNA. أما عيوبها فهي السمية المحتملة التي يمكن أن تسببها لبعض أنواع الخلايا، وإمكانية تأكسد أسطحها مما يؤثر على ارتباط الـ DNA عليها، بحيث يقل هذا الارتباط مع مرور الوقت، كما أنها تعد غير متجانسة الشكل والحجم وبالتالي من الصعب ضبط الحجم المناسب لنوع معين من الخلايا.

تحضير كمية من جزيئات التنغستين تكفي لـ 20 طلقة

- توزن كمية ١٠ مغ من مسحوق التنغستين (Bio-Rad Tungsten M-17).
- تضاف كمية 1 مل ايثانول مطلق ١٠٠% (يفضل فتح عبوة جديدة).
- التسخين على درجة حرارة ٩٥ ° م مئوية لمدة ساعتين.
- التثفيل في جهاز الطرد المركزي على السرعة القصوى لمدة ١٠ ثواني.
- التخلص من الرائق (الكحول) ويضاف مرة أخرى كمية 1 مل ايثانول مطلق ١٠٠%.
- التعريض للأمواج فوق الصوتية sonication لمدة 5 دقائق، تكرر العملية ثلاث مرات (تفيد عملية الغلي والتعريض للأمواج فوق الصوتية في إزالة الأكسدة السطحية).
- التثفيل في جهاز الطرد المركزي على السرعة القصوى لمدة ١٠ ثواني. يمكن التخزين في هذه المرحلة طوال الليل بدرجة - ٢٠ ° م.
- التخلص من الكحول الايثيلي وإعادة تعليق الراسب في كمية 1 مل ماء مقطر ومعقم. التثفيل لمدة 10 ثواني.
- التخلص من الماء وتكرار عملية الغسيل ثلاث مرات أخرى. من الضروري إزالة كل بقايا الكحول الاثيلي أثناء عمليات الغسيل المتكررة بالماء لتجنب تكتل بالجزيئات.
- يعاد تعليق الراسب النهائي في كمية ٢٠٠ ميكروليتر ماء مقطر ومعقم.

تحميل جزيئات التنغستين بكمية من الـ DNA تكفي لـ 5 طلقات

- توضع الأنابيب في الثلج وتضاف الكميات التالية على التوالي:

٥٠ ميكروليتر من معلق جزيئات التنغستين.

١٠ ميكروغرام DNA التي حضرت سابقاً في محلول الـ TE (تركيز 1ميكروغرام/ميكروليتر).

٢٠ ميكروليتر سبيرميدين (تركيز ١٠٠ ميكرومولر).

- تخلط المكونات لمدة ٣٠ دقيقة على الرجاج vortex في غرفة باردة.
- تضاف كمية ٢٠٠ ميكروليتر كحول ايثيلي.
- التثفيل في جهاز الطرد المركزي على السرعة القصوى لمدة ١٠ ثواني.
- التخلص من الرائق وإضافة كمية ٢٠٠ ميكروليتر كحول ايثيلي مطلق ١٠٠% لتعليق الراسب. يتم في هذه المرحلة التأكد من تفريق كل التكتلات.

- تكرر عملية الغسيل بالكحول ايثيلي مع الترسيب لثلاث مرات.
- يعلق الراسب بعد مرحلة الغسيل الأخيرة في كمية ٣٠ ميكروليتر كحول ايثيلي.
- تستخدم كمية ٥ ميكروليتر في الطلقة الواحدة.

تحميل الـ DNA على جزيئات الذهب

تتوفر جزيئات الذهب في مجال محدود من حيث أحجامها، لكنها تتميز بانها دائرية واكثر تجانساً في الحجم مقارنة بالتنغستين. الميزة الرئيسية لجزيئات الذهب هي تماثلها (مقارنة بجزيئات التنغستين) مما يسمح بضبط الحجم المناسب منها تبعاً لنوع النسيج النباتي المراد استخدامه في التحوير الوراثي. والأهم من ذلك هو أن الذهب خامل بيولوجياً ولا يسبب سمية للخلايا النباتية المستهدفة. لكن يؤخذ على جزيئات الذهب بأنها غالية الثمن. تشتت جزيئات الذهب ليس ثابتاً في المعلقات المائية ومع مرور الزمن تتكتل الجزئيات بشكل غير عكوس، لذلك يجب أن تحضر الجزيئات التي ستستخدم في الإطلاق في نفس اليوم ولا تخزن لاستخدامها في وقت لاحق (Rasco-Gaunt *et al.*, 1999)

يتم الحصول على هذه الجزيئات من شركة Bio-Rad.

تحضير كمية تكفي للقيام بـ ١٦ طلقة

- توزن كمية 1 مغ من جزيئات الذهب (أقطارها ٠.٦ ميكرومتر).
- تعلق جزيئات الذهب في كمية ١٠٠ ميكروليتر كجول ايثيلي مطلق (يفيد ذلك في تطهيرها بقتل الجراثيم المحمولة سطحياً كما يشحنها بشحنة موجبة).
- التثفيل على السرعة القصوى لمدة قصيرة.
- التخلص من الرائق.
- غسل جزيئات الذهب في كمية ١ مل ماء مقطر ومعقم للتخلص من الكحول.
- تثفيل سريع .
- التخلص من الرائق.
- تعليق الجزيئات في ٥٠ ميكروليتر ماء معقم.
- تضاف كمية ٥٠ ميكروليتر كلوريد الكالسيوم (٢.٥ ميللي مولر). يتم السحب بالماصة للأعلى والأسفل حتى تمزج جيداً.
- تضاف كمية ٢٠ ميكروليتر سبيرميدين (١٠٠ ميللي مولر). اسحب يتم السحب بالماصة للأعلى والأسفل حتى تمزج جيداً.

- إضافة كمية ٥ ميكروغرام DNA (عادة ٥ ميكروليتر). يتم السحب بالماصة للأعلى والأسفل حتى تمزج جيداً.
- تخلط على الرجاج Vortex لمدة ١٠ دقائق على سرعة معتدلة.
- التثفيل في جهاز الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق على أخفض سرعة ممكنة.
- التخلص من الرائق.
- غسل الراسب بكمية ١٠٠ ميكروليتر كحول ايثيلي ١٠٠%.
- التخلص من الرائق (في حال تشكل عكارة من الراسب يمكن التثفيل على أخفض سرعة ممكنة)
- يعلق الراسب في كمية ٨٥ ميكروليتر كحول ايثيلي مطلق ١٠٠%.
- التعريض للأمواج فوق الصوتية Sonication لمدة ١٠ ثواني مباشرة قبل توزيعها على الأقراص الحاملة macrocarrier.
- استخدام ٥ ميكروليتر لكل طلقة.

تحضير العينات النباتية

يعتمد الجزء النباتي المراد استخدامه على النوع النباتي المراد تحويره وراثياً وكذلك على وسط الزراعة. عموماً، استخدم وسط تحريض تشكل النموات الخضرية (SIM) shoot induction medium للنباتات ثنائيات الفلقة. أما بالنسبة للنباتات أحادية الفلقة، فالأجزاء النباتية المختارة هي الأجنة (إما الناضجة أو غير الناضجة) أو معلقات الكالوس (الكنب) وغالباً ما يطلق عليها وهي على وسط تحريض الكالوس callus induction medium (CIM).

جمع سنابل القمح والتطهير السطحي:

تجمع السنابل تقريباً بعد ١٢-١٦ يوماً بعد الإزهار، يمكن فتح بضعة بذور عند وقت الجمع لتحديد حجم وبنية الأجنة والتي يجب أن تكون بطول ما بين ٠.٨-١.٥ مم وشفافة المظهر.

تطهر البذور سطحياً بالغسيل في الكحول الايثيلي تركيز ٧٠% لمدة دقيقة واحدة، ثم لمدة ١٥ دقيقة في محلول منظف (Clorox) مع التحريك الخفيف. تغسل بعدها بالماء المقطر والمعقم لثلاث مرات على الأقل.

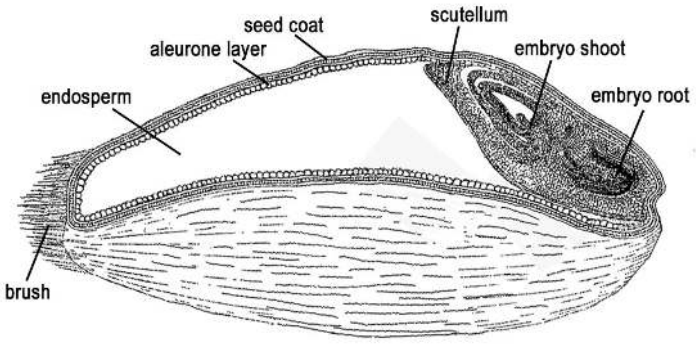
لاحظ، بسبب التطور غير المتزامن للسنبلة، فإن فقط نصف أو ثلثي السنيبلات علي أي سنبلة يمكن أن تحتوي الطور المناسب. عادة ما تحوي السنيبلات الموجودة في قاعدة السنبلة أو القريبة من حامل السنبلة على الأجنة الأصغر عمراً وحجماً وفي طور غير مناسب للاستخدام.

عزل الأجنة غير الناضجة.

تعزل الأجنة غير الناضجة من البذور تحت المكبرة binocular في جو معقم (داخل حجرة العزل) باستخدام مشرط حاد معقم.

التخلص من محور الجنين أولاً ثم ونحتفظ بالجزء المتبقي الذي سيحرض منه الكالوس ويسمى السكوتيلم scutellum (يوضح الشكل ١ تركيب بذرة القمح).

يوضع السكوتيلم بوضع مقلوب بالنسبة لوضعه الطبيعي في البذرة (مكان الجنين للأسفل والسكوتيلم للأعلى) على وسط العدوى باللقاح في أطباق بتري قطرها ٥٥ مم وبمعدل حوالي ٥٠ جنيناً في كل طبق.



الشكل ١. تشريح بذرة القمح

- **تحضير الأطباق للإطلاق**

توضع الأجنة غير الناضجة (السكوتيلم) بحيث يكون مكان محور الجنين (الذي تمت إزالته) إلى الأسفل بالتماس مع وسط تحريض تشكل الكالوس (CIM) شبه الصلب في أطباق بتري بقطر ٩٠ مم، وبذلك يكون السكوتيلم هو الجزء المعرض لعملية الإطلاق بالجزيئات المحملة بالـ DNA. يوضع ٥٠ جنيناً في مركز كل طبق، ويستخدم عادة ٣-٥ أطباق بتري في كل معاملة. تغلق الأطباق بواسطة البارافيلم وتحضن في الظلام على درجة حرارة ٢٦ º م تقريباً لمدة حوالي ٢٤ ساعة قبل القيام بعملية الإطلاق بواسطة قاصف المورثات gene gun. في اليوم التالي تتم عملية الإطلاق ولمرة واحدة على كل طبق ثم تغلق بالبرافيلم وتحضن في الظلام.

يمكن إجراء عملية التقييم الكيميائي للأنسجة histochemical assay بعد يومين من عملية الإطلاق.

من أجل الحصول على نموات خضرية من الأجنة التي تمت عليها عملية الإطلاق ضمن شروط معينة تم ضبطها مسبقاً؛ يتم أولاً تحريض الكالوس من هذه الأجنة (السكوتيلم) بزراعتها على وسط تحريض الكالوس بمعدل ١٠ أجنة في كل طبق. بعد مضي ثلاثة أسابيع ينقل الكالوس إلى وسط التجديد regeneration medium (RZM) الذي يحوي على ٠.١ مغ/ليتر من الهرمون 2,4-D، وعلى ٥ مغ/ليتر من الهرمون zeatin.. تحضن الأطباق على درجة حرارة ٢٦ ºس وفترة إضاءة ١٢ ساعة. يتم تسجيل عدد الكالوس التي تمايزت إلى أنسجة خضراء بعد ٣ أسابيع من زراعتها على وسط التجديد.

- **تحضير الجهاز لعملية الإطلاق**

- نحتاج في كل عملية إطلاق إلى رقاقة تمزق rupture disc (تتحمل مجال ضغط ٩٠٠ – ١١٠٠ باوند على البوصة المربعة psi)، وإلى رقاقة حاملة للجزيئات وإلى شبك معدني لإيقاف الرقاقة الحاملة للجزيئات.
- قبل القيام بعملية الإطلاق نقوم بتعقيم كل الأجزاء المعدنية (حامل رقاقة التمزق rupture disc holder، الشبك المعدني stopping screens، حامل الرقاقات الحاملة للجزيئات macrocarrier holder) في الأوتوكلاف autoclave.
- تعقم الأجزاء المرنة المصنوعة من اللدائن (رقاقات التمزق rupture discs والرقاقات الحاملة للجزيئات fliers) بغمرها في أطباق بتري بالكحول الايثيلي تركيز ٧٠% لمدة ٣٠ دقيقة أو أكثر.
- تترك رقاقات التمزق في الكحول الايثيلي مع تغطية الأطباق لمنع تطاير الكحول، بينما تزال الرقاقات الحاملة للجزيئات وتجفف بشكل كامل بعد إنقضاء الفترة اللازمة للتطهير.
- يتم وضع الرقاقات الحاملة للجزيئات في مكانها المخصص (حامل الرقاقات macrocarrier) باستخدام ملقط معقم. توضع الكمية المناسبة من الـ DNA (عادة كمية ٥ ميكروليتر من خليط الـ DNA مع جزيئات الذهب) على الرقاقة وتترك لتجف تماماً.
- تمسح الأجزاء الداخلية الثابتة من جهاز قاصف المورثات بالكحول تركيز ٧٠%.
- أيضاً تمسح باقي الأجزاء المتحركة الموجودة داخل الجهاز (مجمع عملية القذف، حامل طبق البتري، الغطاء المعدني) بواسطة الكحول تركيز ٧٠%.
- غسل اليدين والقفازات بالحول الايثيلي تركيز ٧١%.
- يتم التعامل الآن مع الأجزاء المختلفة أثناء التحميل باستخدام ملاقط معقمة بشكل جيد وتحت ظروف معقمة أيضاً (يتم العمل داخل حجرة العزل).

- يتم تركيب مجمع القذف على النحو التالي: يوضع الشبك المعدني في مكانه، ثم الرقاقة الحاملة للجزيئات بوضع مقلوب، ثم يركب الغطاء الذي يثبت هذه الأجزاء مع بعضها.
- توضع رقاقة التمزق في حاملها ثم يثبت هذا الأخير على مكانه داخل حجرة الإطلاق ويثبت بواسطة مفتاح شد خاص (الشكل ٢).

عملية الإطلاق:

- يوضع مجمع القذف في مكانه داخل حجرة الإطلاق.
- يوضع طبق البتري (بعد رفع غطائه) الحاوي على الأجنة داخل حجرة الإطلاق.
- يغلق باب الحجرة.
- تشغل مضخة التفريغ vaccum حتى تصل قيمة التفريغ داخل الحجرة إلى ٢٨ إنش زئبقي (in.Hg).
- يضغط على الزر الوسطي (الوضع السفلي hold) للمحافظة على وضع التفريغ داخل الحجرة.
- الضغط بشكل مستمر على زر الإطلاق Fire حتى سماع صوت حدوث الإطلاق.
- تحرير زر الإطلاق ثم الضغط على الزر الوسطي (الوضع الوسط ventilation) حتى يعود الضغط إلى وضعه الطبيعي داخل الحجرة وعودة المؤشر على مقياس الضغط إلى ٠ إنش زئبقي.
- يفتح باب الحجرة ثم يؤخذ الطبق ويوضع عليه الغطاء ويغلق بالبارافيلم.

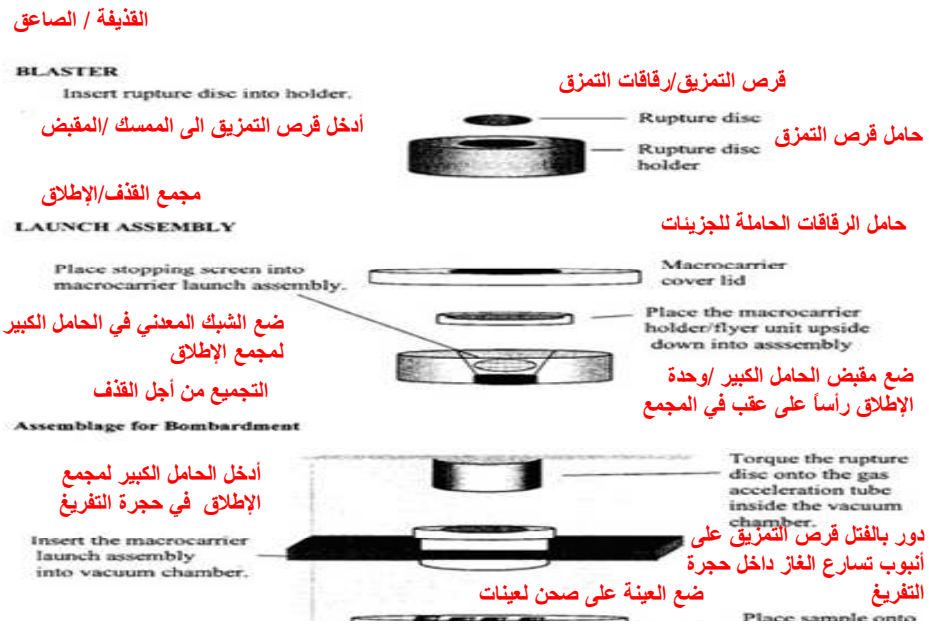
للقيام بعملية إطلاق اخرى

- يتم أخذ مجمع القذف وفكه واستبدال الشبك المعني والتخلص من الرقاقة الحاملة، ثم تحضير رقاقة أخرى كما مر سابقاً.
- فك حامل رقاقة التمزق والتخلص من الرقاقة الممزقة بأخرى جديدة ثم إعادة تركيبه في مكانه.
- عند الانتهاء من عمليات الإطلاق تغلق الأطباق بواسطة البارافيلم، ثم تحضن في الظلام تحت ظروف مناسبة من الحرارة.

تتم عملية الانتخاب بنقل الكالوس إلى وسط انتخاب مناسب تبعاً للبلازميد أو قطعة الـ DNA التي تم تحميلها الجزيئات الذهب أو بالتحديد تبعاً لمورثة الانتخاب في النبات selectable marker gene in plant.

Biolistic® -PDS-1000/He Particle Delivery System

شكل ٢. مخطط يبين إعداد المدفع الجيني/ قاصف المورثات من نوع Biolistic©-PDS-1000/He وإجراء القذف للتحوير الوراثي للعينات النباتية



الشكل ٢. جهاز المدفع الجيني / قاصف المورثات من نوع Biolistic©-PDS-1000/He

- **الأوساط المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية**

يمكن تحضير الأوساط المغذية اللازمة لزراعة الأنسجة بتحضير مخزون لهذه المحاليل بتركيز مضاعف (الجدول ١) حتى نستطيع أن نضيف لها حجم مماثل من عامل تصلب الوسط gelling agent (يستخدم الفيتاجل phytagel مع وسط تحريض الكالوس، والآجار agargel مع وسط التجديد RZM ووسط التجذير RM). أيضاً يحضر عامل تصلب الأوساط المغذية بتركيز مضاعف (٤ غ/ليتر فيتاجل و ١٠ غ/ليتر آجار) ثم تعقم على درجة حرارة ١٢١ °م لمدة ٢٠ دقيقة.

الجدول ١. مكونات أوساط الزراعة المحضرة بتراكيز مضاعفة. كل التراكيز المذكورة أدناه هي ضعف تركيز المطلوب لوسط الزراعة ماعدا المكونات التي تضاف بعد ضبط درجة الحموضة pH فقد ذكرت بتراكيزها النهائية.

Component المكونات والانتخاب	Inoculation (/L) وسط العدوى	CIM (/L) وسط تحريض الكالوس	RZM (/L) وسط تجديد النموات	RPPT (/L) وسط التجديد
MS macro salts (x10)	200 ml	200 ml	200 ml	200 ml
L7 micro salts (x1000)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
FeNaEDTA (x100)	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
MS vitamins (x1000)	2 ml	2 ml	-	-
Vitamins/Inositol (x200)	-	-	10 ml	10 ml
Inositol	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Glutamine	1 g	1g	-	-
Casein hydrolysate	200 mg	200 mg	-	-
MES	3.9 g	3.9 g	-	-
Maltose	80 g	80 g	60 g	60 g
	pH adjusted to 5.8 then autoclaved		pH adjusted to 5.7 then filter sterilized	
2,4-D	2 mg	0.5 mg	0.1 mg	-
Picloram	2.0 mg	2.0 mg	-	-
Acetosyringone	200 µM	-	-	-
Timentin	-	160 mg	160 mg	160 mg
Zeatin	-	-	5 mg	-
PPT	-	-	-	2-4 mg

Inoculation : وسط العدوى / CIM:وسط تحريض الكالوس /

RZM: وسط التجديد / RPPT :وسط التجديد والانتخاب

- **مخزون المحاليل المستخدمة في تحضير الأوساط المغذية**

Stock solutions for basal culture media

- **MS Macrosalts (x10)**

16.5 g/l NH_4NO_3	نترات الأمونيوم
19.0 g/l KNO_3	نترات البوتاسيوم
1.7 g/l KH_2PO_4	فوسفات البوتاسيوم
3.7 g/l $MgSO_4 . 7H_2O$	كبريتات المغنيزيوم
4.4 g/l $CaCl_2 . 2H_2O$	كلوريد الكالسيوم

ملاحظة ١: تذاب كل مادة على حدة بالماء المقطر قبل خلطها مع بعضها البعض، ثم يعقم المزيج في الأوتوكليف على درجة حرارة ١٢١ ° م لمدة ٢٠ دقيقة ويحفظ في البراد على درجة حرارة ٤ ° م.

- **L7 Microsalts (x1000)**

15.0 g/l $MnSO_4$	كبريتات المنغنيز
5.0 g/l H_3BO_3	حمض البوريك
7.5 g/l $ZnSO_4 . 7H_2O$	كبريتات التوتياء
0.75 g/l KI	يوديد البوتاسيوم
0.25 g/l $Na_2MoO_4 .2H_2O$	مولبيدات الصوديوم
0.025 g/l $CuSO_4 .5H_2O$	كبريتات النحاس
0.025 g/l $CoCl_2 .6H_2O$	كلوريد الكوبالت

ملاحظة ٢: يمكن أن توجد كبريتات المنغنيز بشكل مستحضرات مختلفة من حيث عدد ذرات الماء الداخلة في تركيبها ولذلك يجب أخذ ذلك بعين الاعتبار. مثلاً بالنسبة للمركب $MnSO_4 .H_2O$ يضاف ١٧.٠٥ غ/ل وبالنسبة لـ $MnSO_4 .4H_2O$ يضاف ٢٣.٢٢ غ/ل، وبالنسبة لـ $MnSO_4 .7H_2O$ يضاف 27.95 غ/ل.

- تحضر كمية ١٠٠ مل من المخزون المركز في المرة الواحدة، ويعقم بالفلترة filter sterilization ثم يخزن في البراد على درجة حرارة ٤ ° م.

- **MS Vitamins (-Glycine) (x1000):**

0.1 g/l Thiamine HCl	الثيامين
0.5 g/l Pyridoxine HCl	البيريدوكسين
0.5 g/l Nicotinic acid	حمض النيكوتين

- تحضر كمية ١٠٠ مل من المخزون المركز في المرة الواحدة، ويعقم بالفلترة filter sterilization ثم يخزن في البراد على درجة حرارة ٤ ° م.

- **Vitamins/Inositol (x200):**

40.0 g/l Myo-Inositol	ميبواينوزيتول
2.0 g/l Thiamine HCl	الثيامين
0.2 g/l Pyridoxine HCl	البيروديكسين
0.2 g/l Nicotinic acid	حمض النيكوتين
0.2 g/l Ca-Pantothenate	بانتوثينات الكالسيوم
0.2 g/l Ascorbic acid	حمض الأسكوربيك

- تحضر كمية ١٠٠ مل من المخزون المركز في المرة الواحدة، ويعقم بالفلترة filter sterilization ثم يخزن في البراد على درجة حرارة ٤ ° م.

المواد المضافة

- الزياتين Zeatin (١٠ مغ/مل): يذاب المسحوق في كمية قليلة من محلول حمض كلور الماء HCl (١ مولر) ثم يكمل الحجم بالماء المقطر والمعقم، يخلط المزيج على الرجاج ثم يعقم بالفلترة ويوزع على أنابيب بمعدل ١ مل. يحفظ على درجة حرارة – ٢٠ ° م.
- بيكلورام Picloram (١ مغ/مل): تحل كمية مناسبة منه في الماء، يعقم بالفلترة ويوزع على انابيب سعة ٢ مل، ثم يحفظ على درجة حرارة – ٢٠ ° م.
- الفوسفينوثريسين Phosphinothricin (PPT) أو أمونات الغلوفوسينات: تحل كمية مناسبة منه في الماء، يخلط المزيج على الرجاج ثم يعقم بالفلترة ويوزع على أنابيب بمعدل ١ مل. يحفظ على درجة حرارة – ٢٠ ° م.

٢.٣. التحوير الوراثي للحمص بوساطة بكتريا التدرن التاجي (أغروباكتريا)
Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation system of chickpea

تتم عملية التحوير الوراثي للحمص بوساطة بكتريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens* وفق الجدول الزمني التالي:

اليوم ١	تعقيم البذور
	زراعة البكتريا
اليوم ٢	تنفيذ التحوير الوراثي (العدوى بالبكتريا)
	الزراعة المشتركة
اليوم ٦	غسيل النبيتات explants (الأجزاء النباتية التي أعديت بالبكتريا)
	التجديد على وسط الزراعة ١
اليوم ١٣/١٤	التجديد والانتخاب الأولي على وسط الزراعة ٢
اليوم 35	الانتخاب على وسط الزراعة ٣
اليوم ٤٩	الانتخاب على وسط الزراعة ٤
اليوم 63	الانتخاب على وسط الزراعة ٥
اليوم 77	الانتخاب على وسط الزراعة ٦
اليوم ٩١	الانتخاب على وسط الزراعة ٧
اليوم ١٠٥	الانتخاب الأولي على وسط الزراعة ٨
اليوم ١١٩	الانتخاب على وسط الزراعة ٩
اليوم ١٣٣	الانتخاب الأولي على وسط ١٠
اليوم ١٤٧	التجذير على وسط HR أو التطعيم

- **الاجراءات Procedures**

اليوم ١: تطهير البذور سطحياً وتنمية البكتريا

١. توزن كمية معينة من البذور.
٢. توضع البذور في حوجلة وتغسل مرتين بماء الصنبور.
٣. تغمر البذور بكمية كافية من الكحول الايثيلي (٧٠%) ثم تغلق فوهة الحوجلة بقطعة من ورق الألمنيوم بشكل جيد وتحرك البذور في الكحول لمدة ١ دقيقة.
٤. التخلص من الكحول وغمر البذور بكمية كافية من الكلوركس chlorox (٥٠%) مع التحريك على الهزاز shaker لمدة ٢٠ دقيقة (يجب ألا تزيد سرعة الدوران عن ١٥٠ دورة في الدقيقة).
٥. تغسل البذور بالماء المقطر والمعقم ثلاث مرات على الأقل، ثم تنقع طوال الليل في ١ ليتر من الماء المقطر والمعقم أضيف له ١٠ مل من محلول كلوريد الكالسيوم (تركيز ٢ مولر).
٦. تنمى البكتريا في وسط سائل بإضافة 400 µl من مخزون الغليسيرول glycerol stock وتضاف إلى ٢٥ مل من وسط MG السائل مع مضاد حيوي مناسب (المضاد الحيوي اللازم لانتخاب البلازميد في البكتريا).
٧. التحضين في حمام مائي على درجة حرارة ٢٧-٢٩ °م مع التحريك على سرعة ١٥٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٢-٢٤ ساعة (حتى نحصل على كثافة إمتصاص optical density أكثر من ١ على طول موجة ٦٠٠ نانومتر) (OD_{600} >1).

اليوم ٢: التحوير الوراثي والزراعة المشتركة

١. ترسب البكتريا بالتثفيل في جهاز الطرد المركزي لمدة ١٠ دقائق على سرعة ٤٥٠٠ g ودرجة حرارة ٤ °س، ثم نتخلص من الرائق ونعلق الراسب في كمية ٢٠ مل من وسط التلقيح السائل (وسط العدوى) الحاوي على ٢٠٠ ميكرومولر أسيتوسيرنغون acetosyringone .
٢. تقطع البذور في منتصفها بواسطة مشرط معقم ثم تفصل الأجنة عن الفلقات بعناية، وتجمع هذه الأجنة في طبق بتري يحوي ماء مقطر ومعقم.
٣. يوضع المعلق البكتيري في طبق بتري صغير، ثم يقطع ١-٢ مم من القمة النامية وحوالي ١ مم من نهاية الجذير وذلك بواسطة مشرط حاد معقم تم تلويثه بالمعلق البكتيري. تنقل الأجنة بعد قطع قممها النامية إلى المعلق البكتيري (يراعى المحافظة على نصل المشرط مرطباً بالمعلق البكتيري اثناء عملية القطع واستبداله عن قطع حوالي ٦٠ جنيناً)

٤. تحضن الأجنة التي قطعت قممها النامية decapitated embryos في المعلق البكتيري لمدة ٢-٤ ساعات في الظلام وعلى درجة حرارة الغرفة.

٥. يسحب المعلق البكتيري، ثم تنقل الأجنة إلى ورقة ترشيح معقمة وضعت فوق وسط الزراعة المشتركة chickpea co-cultivation medium(CCCP). يوضع حوالي ٢٠ جنيناً في كل طبق وتغلق بالبارافيلم، ثم تحضن الأطباق في الظلام على درجة حرارة ٢١ °س لمدة ٤ أيام.

اليوم ٦: التجديد على وسط الزراعة ١:

١. بعد انقضاء فترة الزراعة المشتركة، يقطع الجزء المعقوف من جذيرالجنين ثم تنقل الأجنة الى أنبوب فالكون Falcon tube معقم سعة ٥٠ مل.

٢. تغسل الأجنة في ٣٥ مل ماء مقطر ومعقم ثلاث مرات.

٣. بعد ذلك، تغمر الأجنة في محلول يحوي ١٥٠ مغ/ل من المضاد الحيوي تيكارسيللين ticarcillin (أضف كمية ٣٧.٥ ميكروليتر تيكارسيللين(تركيز ١٠٠ مغ/مل) لكل ٢٥ مل ماء) لقتل البكتريا وتترك على درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠-٦٠ دقيقة.

٤. تجفف الأجنة على ورق فلتر معقم (للتخلص من المحلول الزائد) ثم تزرع على وسط الزراعة ١ تحت الاضاءة لمدة ٧-٩ أيام بدرجة ٢١-٢٥ °م.

اليوم ١٣/١٤: التجديد والانتخاب الأولي على وسط الزراعة ٢:

تنقل الأجنة (النبيتات) إلى وسط الزراعة ٢ ، ثم تحضن لمدة ٢١ يوماً تحت نفس الشروط السابقة.

اليوم ٣٥: الانتخاب على أوساط الزراعة ٣ و ٤:

١. التخلص من الأنسجة بنية اللون أوالأنسجة الميتة التي تشكلت على الجزء القاعدي من النبيتات.

٢. تقسم النبيتات إلى ٣ أجزاء (جزء للأفرع الخضرية التي تطورت من القمة النامية للجنين وجزءان للأفرع الناشئة من البراعم الفلقية) وتوضع في حقل واحد. لا تضع أكثر من ٩-١٠ نبيتات في كل طبق بتري.

٣. تحضن الأطباق لمدة أسبوعين تحت نفس الشروط السابقة.

اليوم ٤٩: الانتخاب على وسط الزراعة ٤ وحتى ١٠:

يتم التخلص من الأنسجة الميتة قبل أي عملية نقل ثم تزرع النبيتات الحية على وسط انتخاب جديد حتى مرحلة الانتخاب ١٠ وبفاصل أسبوعين في كل مرة.

اليوم ١٤٧: التجذيرعلى وسط التجذير HR:

١. تنقل النبيتات التي اجتازت كل مراحل الانتخاب putative transgenic explants على وسط التجذير HR في أطباق بتري لمدة ٣ أسابيع.
٢. تنقل النبيتات التي تشكلت عليها الجذور إلى وسط آجار طري soft agar. عند تشكل مجموع جذري جيد،تنقل النباتات إلى بيتموس معقم في الأصص من أجل الأقلمة.

التطعيم الدقيق للنموات الخضرية micro-grafting of shoots (Krishnamurthy *et al*., 2000)

غالباً يكون من الصعب تحريض عملية التجذير على نبيتات الحمص باستخدام الهرمونات النباتية، لذلك نلجأ لعملية التطعيم الدقيق على أصل غير محور وراثياً، ويتم ذلك على النحو التالي:

١. تطهر بذور الحمص سطحياً ثم تزرع على وسط ½MS، وتحضن في الظلام على درجة حرارة ٢٥ °م لمدة ٥ أيام.
٢. تقطع السويقة الجنينية للبادرة عرضياًعلى مسافة ١-١.٥ سم فوق العقدة الفلقية، ثم يتم عمل شق طولي في السويقة.
٣. يشذب الجزء القاعدي من النبيتة المحورة وراثياً على شكل حرف V ثم تدخل في الشق الطولاني الذي أحدث في السويقة.
٤. خلال الأيام التالية، تزال كل النموات الثانوية التي تنشأ من البراعم الفلقية للأصل من البادرة غير المحورة.
٥. تنقل النباتات بعد شهر إلى التربة لأقلمتها.

- **أوساط زراعة الأنسجة النباتية للحمص Media for plant tissue culture**

١. مكونات مخزون المحاليل الأساسية solution stocks

- **DKW-C Stock I (x 10)**

Chemical	Formula	mg/ L media	g/L
Calciumchloride	$CaCl_2$	149	1.49
Magnesium sulfate	$MgSO_4.7H2O$	740	7.4
Potassium sulfate	K_2SO_4	1559	15.59
Ammonium nitrate	NH4NO3	1416	14.16
Potassium phosphate	KH_2PO4	265	2.65
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2.4H2O$	1968	19.68

- **DKW-C Stock II (x 100)**

Iron stock	Fe-Na-EDTA	44.63	4.46
Manganese sulphate	$MnSO_4.H2O$	33.5	3.35
Zinc sulphate	$ZnSO_4.7H2O$	9.22	0.922
Boric acid	H_3BO_3	4.8	0.48
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39	0.039
Cupper sulphate	$CuSO_4.5H_2O$	0.25	0.025

- **DKW-C stock III (x 100)**

Myo-inositol		100	10
Nicotinic acid		1	0.1
Glycine		2	0.2
Thiamine		2	0.2

- **Microsalts solution (x 100)**

Manganese sulphate	MnSO4.H2O	1.69
Iron stock	Fe-Na-EDTA	4
Zinc sulphate	ZnSO4.7H2O	0.86
Boric acid	H3BO3	0.63
Sodium molybdate	Na2MoO4.2H2O	0.025
Cupper sulphate	CuSO4.5H2O	0.0025
Cobalt chloride	CoCl2.6H2O	0.0025
Potassium Iodide	KI	0.083

٢. مكونات أوساط الزراعة components of media culture

Item	Agorsuspension	CCCP	Sub1	Sub2	Sub 3+4	HR
MS salts	500 ml package	-	-	-	-	-
DKW-C stock I	-	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
DKW-C stock II	-	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
DKW-C stock III	-	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
MS microsalts	1.5 ml	3 ml	-	-	-	-
B5 vitamins	5 ml	10 ml	-	-	-	-
Sucrose	7.5 g	15 g	30 g	30 g	30 g	20 g
Glucose	7.5 gr	15 g	-	-	-	-
Aceosyringone	5 ml	-	-	-	-	-
TDZ (0.5 mg/ml)	110 µl	22 µl	-	-	-	-
BAP	-	-	-	2 ml	2 ml	-
IBA	-	-	-	10 µl	10 µl	2.5 ml
MES	-	-	-	1 g	1 g	1 g
PVP	-	-	-	-	-	-
Phytagel	-	0.2 %	0.3%	0.3%	0.3%	0.8 %
Agar	-	-	-	-	-	-
pH	5.7					5.8
Ticarcillin	-	-	150 mg	150 mg	150 mg	-
PPT	-	-	-	-	5-10 mg	-

٢.٤. الكشف عن المواد المعدلة وراثياً بالطرائق المعتمدة على كشف الـ دنا المأشوب
GMO detection DNA- based methods

٢.٤.١. العينات المستخدمة:

استخدم خلال الدورة التدريبية عينات مواد غذائية وعلفية مجهولة (الجدول ١) من أجل اختبارات التفاعل التسلسلي للبوليمراز (بي سي أر)، التقليدي وال بي سي أر بالزمن الحقيقي، بالإضافة إلى مواد مرجعية قياسية تحوي نسب تعديل وراثي معروفة (٠، ٠.١ %، ٠.٥%، ١% و ٢%) من أجل ا ل بي سي أر بالزمن الحقيقي من المخبر المرجعي الأوروبي للمفوضية الأوروبية. يستخدم شاهد سلبي وشاهد ايجابي أثناء الاستخلاص، لا يوضع دنا في الشاهد ويتم اختبار شاهد سالب وشاهد موجب في تفاعلي ا لـ بي سي أر العادي وال بي سي ار بالزمن الحقيقي.

جدول ٢. قائمة العينات الموزعة للمشاركين في الدورة

نوع العينة **Sample Type**	الرمز **Code**	رقم المجموعة **Group**
Feed sample عينة علف	S1	1
Soya feed 1, Argentina علف صويا ١ من الأرجنتين	A5	
Soya feed 2, Argentina علف صويا ٢ من الأرجنتين	A4	
Imported soya, oil factory صويا مستوردة ، من معمل زيت	A6	
Feed sample عينة علف	S2	2
Soya seeds 1, Agri Research Center, Aleppo بذور صويا ١ من مركز البحوث الزراعية في حلب	Sb-321	
Soya seeds 2, Agri Research Center, Aleppo بذور صويا ٢ من مركز البحوث الزراعية في حلب	Sb-330	
Cultivated soya, Agri Research Center, Aleppo صنف صويا مزروع من مركز البحوث الزراعية في حلب	Sb-304	
Maize, Argentina حبوب ذرة مستوردة من الأرجنتين	M16	3
Feed soya 1 (poultry), Kefernabel علف صويا ١ (دواجن) كفرنبل	S3	
Feed soya 2 (poultry), Kefernabel علف صويا ٢ (دواجن) كفرنبل	S4	
Maize sample ذرة	M0	
Canned Food, Soumar غذاء معلب (مرتديلا سومر)	C1	1
Canned Food, Hana غذاء معلب (مرتديلا هنا)	C2	2
Canned Food, Zeina غذاء معلب (مرتديلا زينة)	C3	3

٢.٤. ٢. طريقة استخلاص الـ دنا من عينات الغذاء وعينات العلف (بروتوكول CTAB)

الأجهزة والأدوات:

- أدوات لتصغير الحجم مثل نصل شفرات جراحية معقمة أو هاون بورسلان.
- حمام مائي أو أداة تسخين
- جهاز طرد مركزي صغير (ميكروفيوج)
- ماصات
- جهاز مزج فورتكس (هزاز)
- أنابيب بلاستيكية سعة ١.٥ مل.
- ملعقة مبسطة
- ميزان حساس دقة 0.01 غ.
- حلقة Loop
- حامل للأنابيب
- ملوق Spatulas /ملعقة ستيل
- خياري: مجفف بالتفريغ لتجفيف بيليت الـ دنا.

ملاحظة: كل الأدوات المستخدمة يجب أن تكون معقمة وأي بقايا أو أثار من الـ دنا يجب إزالتها.

من أجل تجنب التلوث، استخدم رؤوس ماصات ذات فلتر للحماية من أية غازات،ايروسول/ سوائل.

المواد الكيماوية والكواشف

- سيتيل تري ميثيل أمونيوم بروميد CTAB
- كلوروفورم
- ايزوبروبانول
- شيلات الحديد Na2EDTA
- ايثانول
- كلور الصوديوم
- أنزيم بروتيناز ك Proteinase K
- الأنزيم المفكك للـ رنا RNase A
- تريس (هيدروكسي ميثيل) أمينوايثان هيدروكلوريد (Tris-HCl)
- ماء مقطر منزوع الأيونات معقم

ملاحظات هامة:

- كل المواد الكيماوية المستخدمة يجب أن تكون نقية مصنفة بدرجة نقاوة مواد البيولوجيا الجزيئية.

- الماء منزوع الشوارد والمحاليل الواقية يجب أن تعقم بالاتوغلاف قبل الاستخدام.
- كل المواد الكيمياوية المستخدمة يجب أن تكون خالية من الـ دنا ومن الأنزيمات المفككة للـ دنا.

محلول CTAB / CTAB-buffer

20 g/l	CTAB	20 g
1.4 M	NaCl	16.4 g
0.1 M	Tris-HCl	3.15 g
20 mM	Na2EDTA	1.5 g

- أضف ١٠٠ مل ماء مقطر منزوع الأيونات معقم
- عدل الحموضة إلى 8.0 بهيدروكسيد الصوديوم ١نظامي
- أكمل الحجم إلى ٢٠٠ مل وعقم بالأتوغلاف

محلول ترسيب الـ CTAB ***CTAB-precipitation solution***

5 g/l	CTAB	5 g
0.04M	NaCl	0.5 g

- أضف ١٠٠ مل من الماء المؤين المعقم
- عدل الحموضة إلى 8.0 بهيدروكسيد الصوديوم ١نظامي
- أكمل الحجم إلى ٢٠٠ مل وعقم بالأتوغلاف
- خزن المحلول بدرجة ٤ °م لمدة قصوى ٦ أشهر.
- NaCl 1.2 M كلور الصوديوم ١.٢ مول
- أذب ٧ غ من كلور الصوديوم في ١٠٠ مل ماء منزوع الأيونات
- عقم وخزن بدرجة حرارة الغرفة.
- محلول الايثانول ٧٠% (حجم/حجم)
- امزج ٧٠ مل ايثانول مطلق مع ٣٠ مل ماء منزوع الأيونات معقم
- RNaseA ١٠ ملغ/مل ، خزن بدرجة -٢٠ °م .
- Proteinase K ١٠ ملغ/مل ، خزن بدرجة -٢٠ °م .

طريقة استخلاص الـ DNA الكلي:

تتطلب الإجراءات اتباع شروط معقمة. يمكن تجنب التلوث أثناء تحضير العينات باستخدام أدوات تستخدم لمرة واحدة، ومحاليل تنظيف /تعقيم وبتجنب تشكل الغبار.

وفيما يلي الخطوات المتبعة:

١. رطب ٢٠٠ ملغ من العينة بـ ٣٠٠ ميكرو ليتر ماء منزوع الأيونات معقم في أنبوب سعة ٢ مل.
٢. امزج بحلقة معقمة حتى الوصول إلى التجانس.
٣. أضف لكل أنبوب ٧٠٠ ميكروليتر من محلول الاستخلاص CTAB المسخن مسبقاً على درجة ٦٥ °م. امزج باستخدام الحلقة.
٤. أضف ١٠ميكروليتر من بروتيناز ك (٢٠ ملغ/مل). امزج بهدوء وحضن بدرجة ٦٥ °م، لمدة ٣٠ د.
٥. ثفل لمدة (١٠ دقائق) وبسرعة (X g ١٢٠٠٠) وبدرجة حرارة (٤°م).
٦. انقل الطور السائل إلى أنبوب ٢ مل يحوي 500 µl كلوروفورم، رج لمدة ٣٠ ثانية.
٧. ثفل لمدة (١٥ د.) وبسرعة (X g ١٢٠٠٠) وبدرجة حرارة (٤°م) حتى يتشكل طوران (سائل و صلب).
٨. انقل الطبقة العلوية إلى أنبوب جديد سعة ٢ مل يحوي 500 µl كلوروفورم، رج لمدة ٣٠ ثانية.
٩. ثفل لمدة (٥ د.) وبسرعة (X g ١٢٠٠٠).
١٠. انقل الطبقة العلوية إلى أنبوب جديد سعة ٢ مل.
١١. أضف ضعفي الحجم من محلول ترسيب ال CTAB، امزج بالماصة.
١٢. حضن لمدة ٦٠ د. بدرجة حرارة الغرفة.
١٣. ثفل لمدة (٥ د.) وبسرعة (X g ١٣٠٠٠). تخلص من الطور السائل والاحتفاظ بالطور الصلب (الراسب) .
١٤. أذب الرشاحة (الراسب) في 350 µl كلور الصوديوم (١.٢ مول).
١٥. أضف 350 µl كلوروفورم ورج لمدة ٣٠ ثانية.
١٦. ثفل لمدة (١٠ د.) وبسرعة (X g ١٢٠٠٠) حتى الحصول على طورين منفصلين.

١٧. انقل الطبقة العلوية إلى أنبوب جديد سعة ١.٥ مل.

١٨. أضف ٠.٦ حجم ايزوبروبانول، رج، امزج بهدوء بالقلب رأساً على عقب عدة مرات، حضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ د.

١٩. ثفل لمدة (١٠ د.) وبسرعة (X g ١٢٠٠٠). تخلص من الطور الطافي (السائل).

٢٠. أضف 500 µl ايثانول ٧٠% ورج بهدوء.

٢١. ثفل لمدة (١٠ د.) وبسرعة (X g ١٢٠٠٠). تخلص من الطور الطافي (السائل) بحذر لأنه يمكن أن تنفصل البيليت عند قاع الأنبوب في هذا الطور.

٢٢. يجفف الراسب بدرجة حرارة الغرفة لمدة (٣٠ دقيقة) مع ترك الأنابيب مفتوحة أثناء عملية التجفيف.

٢٣. بعد انتهاء عملية التجفيف، تتم الإذابة بإضافة حوالي (١٠٠ ميكروليتر) من الماء المقطر المعقم لكل أنبوب أو محلول TE حتى تمام عملية ذوبان الـ DNA .

٢٤. يخزن محلول الـ دنا في البراد العادي لمدة أسبوعين كحد أقصى، أو يخزن في المجمدة بدرجة حرارة (-٢٠°م) لفترات أطول إلى حين الاستخدام .

طريقة عزل الـ DNA من العينات النباتية

١. شغل الحمام المائي على درجة ٦٠°م .
٢. احسب عدد العينات واحسب لكل عينة ١ مل من CTAB، ثم ضعها في أنبوب في الحمام المائي.
٣. اجمع ١٥٠ ملغ من الأوراق، ضع في أنبوب تثفيل وارمها في الآزوت السائل.
٤. انقلها إلى جفنة مبردة واطحنها مع الآزوت السائل.
٥. انقل العينة المطحونة بسرعة إلى أنبوب جديد.
٦. أضف ٢ ميكروليتر .Eth لكل ١مل من CTAB وامزج جيداً.
٧. ضع ١مل من المزيج السابق لكل عينة.
٨. خزن في الحمام المائي بدرجة ٦٠°م لمدة حوالي ٦٠ دقيقة.
٩. ضع في الثلج لمدة ٥ دقائق.
١٠. أضف ١مل Cl Mix ، امزج جيداً بالقلب بهدوء.
١١. ثفل لـ ١٥ دقيقة بسرعة ٤٠٠٠ دورة /د.
١٢. انقل الطبقة العلوية إلى أنبوب جديد (حوالي ٦٠٠ ميكروليتر).
١٣. أضف ⅔ الحجم (٤٠٠ ميكروليتر) ايزوبروبانول بارد مخزن على درجة -٢٠°م .
١٤. امزج جيداً بالقلب بهدوء.
١٥. خزن في البراد على -٢٠° لمدة ١٠- ٣٠ دقيقة حتى يترسب الـ DNA.
١٦. ثفل لمدة ١٠ دقائق بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/د.
١٧. اسكب المحلول الطافي بهدوء مع الانتباه لعدم سكب الـ bellet.
١٨. ضع ٢٠٠ ميكروليتر من محلول الغسيل (WB)، وحرك واضرب على الأنبوب/ تسبح البيليت وثفل لمدة ٥ دقائق على سرعة ١٢ ألف دورة / د.
١٩. اسكب محلول الغسيل وأضف ٢٠٠ ميكروليتر RNase + TE buffer وخزن بدرجة ٣٧°م لمدة ٣٠ دقيقة .
٢٠. أضف ١٠٠ ميكرو ليتر أمونيوم أستيت+ ٧٥٠ ميكروليتر ايتانول مطلق بارد، امزج جيداً بلطف.
٢١. ثفل لمدة ١٠ دقائق بسرعة ١٢٠٠٠ rpm
٢٢. اسكب المحلول الطافي (الرائق) وجفف بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ دقيقة أو بدرجة ٣٧° لمدة ٤-٥ دقائق وأضف ١٠٠ ميكروليتر TE buffer، أو ماء مقطر معقم مع الرج والتحريك (الإذابة).
٢٣. خزن بدرجة ٤°م.

٢ . ٤. ٣. اختبار نوعية الـ DNA المستخلص وتقدير تركيزه باستخدام المطياف الضوئي/ سبكتروفوتوميتر

من أجل تحديد كمية الـ دنا /رنا، تؤخذ القراءات على أطوال موجات ٢٦٠ نانومتر والذي يتيح حساب تراكيز الحموض النووية في العينة. ان الامتصاصية /الكثافة الضوئية ١ تعادل حوالي ٥٠ ميكروغرام/مل بالنسبة للـ دنا ثنائي السلسلة و٤٠ ميكروغرام/مل دنا و رنا مفرد السلسلة و٢٠ ميكروغرام/مل أوليغونيوكليوتيدات مفردة السلسلة. نسبة القراءة بين ٢٦٠ / ٢٨٠ نانومتر (OD260/OD280) تعطي تقييم لنقاوة الحمض النووي. المكافئات النقية من الـ دنا والـ رنا للنسبة OD260/OD280 يكون لها قيمة ١.٨ و ٢ على التوالي. عندما يكون هناك تلوث بالبروتينات أو الفينول، فان OD260/OD280 ستكون مختلفة بشكل كبير عن القيم المبينة أعلاه، وبالتالي فان القياس الكمي الدقيق لكمية الحموض النووية غير ممكن (Sambrock *et al.* 1989).

الإجراءات/ الطريقة:

- أضف 20µl من عينة دنا إلى 1980 µl من محلول TE ، امزج جيداً واقرأ الامتصاصية (OD) بجهاز المطياف الضوئي (سبكتروفوتومتر) على طول موجة ٢٦٠ نانومتر.
- أحسب تركيز الـ دنا في المحلول حسب المعادلة التالية:

تركيز الـ دنا (µg/µl) = [الامتصاصية على ٢٦٠X ١٠٠ (معامل التخفيف) X 50 µg/ml] / ١٠٠٠

DNA conc. (µg/µl) = [OD260 x 100 (dilution factor) x 50 µg/ml] / 1000

قراءات السبكتروفوتومتر

Sample no. رقم العينة	absorbance (OD) الامتصاص الضوئي		OD 260/OD280 نسبة الامتصاص ٢٦٠ نانومتر/ ٢٨٠	DNA Conc.(µg/µl) تركيز الـ دنا (ميكروغرام/ميكرولتر)
	260 nm	280 nm نانومتر		
1				
2				
3				

٢ . ٤. ٤. الرحلان الكهربائي بالأغاروز

مقدمة. يجرى فحص نوعية الـ DNA وتحديد درجة تكسره بواسطة الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة أغاروز (gel agarose)، حيث تظهر جزيئات الحمض النووي دنا ذو الوزن الجزيئي الضخم على هلامة الاغاروز كعصابات /كحزمة واضحة بأعلى الهلامة. بينما تبدو الأشكال المكسرة جزئياً كلطخة مشوهة بأحجام طويلة وصغيرة. تعتمد نسبة الاغاروز على حجم جزيئات الـ دنا المراد فصلها حيث تتناسب سرعة هجرة قطع الـ دنا ضمن الهلامة عكسياً مع اللوغاريتم العشري log10 لعدد الأشفاع النيوكليوتيدية المكونة لجزيئة الـ دنا المراد تمريرها ضمن هلامة الأجاروز. حيث يوجد علاقة خطية بين لوغاريتم قابلية حركة جزيئات الـ دنا ضمن الرحلان الكهربائي وتركيز الهلامة **(الجدول ٢).**

جدول ٢. مجال الفصل الفعال في هلامة تحتوي كميات مختلفة من الأغاروز (%)

كمية الاغاروز في الهلامة (تركيز هلامة الأغاروز) وزن/حجم % (W/V)	مجال الفصل الفعال لجزيئات الـ دنا الخيطية مقدرة بـ ألف شفع أساسي kbp
0.5	30 - 1
0.7	12 - 0.8
1.0	10 - 0.5
1.2	7 - 0.4
1.5	3 - 0.2

الطرائق السريعة لتقدير كمية الـ دنا في مثل هذه العينات تتم باظهار الحزم /العصابات بوساطة الأشعة فوق البنفسجية وبمعاملة الهلامة ببروميد الايثيديوم الذي يرتبط مع الـ دنا والـ رنا مشكلا معقداً يتوهج اثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية حيث تتناسب شدة التوهج مع كمية الـ دنا أو الـ رنا المحملة على هلامة الأغاروز، لأن كمية الإشعاع متناسبة مع الكمية الإجمالية للـ دنا، وبالتالي، فان نوعية الـ دنا في العينة يمكن تقديرها بمقارنة نتيجة إشعاع العينة مع إشعاع سلسلة من دنا قياسي ذو وزن جزيئي معروف، مثل lambda DNA ، وهو عبارة عن دنا مستخلص من آكل الجراثيم لامبدا .

أحياناً الـ دنا المعزول يمكن أن يكون ملوث بشكل كبير بمواد أخرى والتي تمتص الأشعة فوق البنفسجية، وبذلك تعيق التحليل الدقيق.

المحاليل المستخدمة: Solutions

1X TAE buffer	40 mM	Tris-Actate
	1mM	EDTA, pH 8.0
Loading buffer (10X)	0.25%	Bromophenol blue
	50%	Glycerol
	60mM	EDTA, pH 8.0

الطريقة:

تحضير هلامة الاغاروز الصغيرة

١. استخدم صفيحة (قالب) سكب الاغاروز المخصصة لتحضير الهلامة ، قم باغلاقها من الجانبين بشريط ورقي لاصق ووضع مشط مناسب (حسب عدد العينات) لتشكيل حفر (جيوب) لوضع العينات المراد فصلها أو دراسة جودتها.
٢. حضر هلامة أغاروز 0.7%، أضف 0.42 غرام أغاروز إلى ٦٠ مل من محلول 1X TAE.
٣. أغل المزيج السابق لفترة وجيزة لتذويب الاغاروز، ثم برده إلى درجة ٦٠°م.
٤. اسكب الهلامة في الصفيحة بهدوء وأزل الفقاعات الهوائية باستخدام رأس ماصة معقم.
٥. بعد تصلب الهلامة تماماً، يزال الشريط اللاصق والمشط وتوضع هلامة الأغاروز مع الصفيحة في جهاز الرحلان الكهربائي، ثم يملأ حوض الرحلان بحوالي ٥٠٠ مل محلول منظم 1X TAE حتى يغطي سطح الهلامة بشكل كامل على ارتفاع ١-٢ سم.

تحميل عينات الـ دنا في الهلامة

١. أضف حوالي عشر ١/١٠ حجم عينة الـ دنا من محلول التحميل loading buffer (تحميل ما يعادل ١ ميكروغرام من الـ دنا المذاب بعد أن يكمل الحجم الى ٩ ميكرولتر من الماء المقطر المعقم ويضاف لها ١ ميكرولتر من سائل التحميل 10X loading buffer مع ضرورة تجنب سيلان العينات الى الحفر المجاورة أثناء تحميل العينات في الحفر/الجيوب). امزج جيداً بالنقر الخفيف ودورها لمدة ٢-٣ ثانية بالميكروفيوج. محلول التحميل له دوران هما:

(١). نظراً لأنه يحتوي غليسرول فانه يجعل العينات أكثف من محلول 1X TAE ويحفظ عينات الـ دنا في الحفر.

(٢). نظراً لأنه ذو لون (أزرق)، يمكن تتبع انتقال وحركة عينات الـ دنا.

٢. حمل عينات الـ دنا بعناية وتجنب التطريش إلى الحفر/الآبار المجاورة. تأكد من إدخال تحميل عينة مؤشر قياسي في أحد الآبار للإشارة لمواقع وحجم الحزم (استخدم ٢٥٠ نانوغرام من phage DNA مقطوع بالأنزيم المحدد *Hind* III).

٣. ضع غطاء جهاز الرحلان الكهربائي، صل الالكترودات، وتأكد من وصل الالكترود السالب (الأزرق) في مكانه في الجهاز. شغل جهاز الطاقة الكهربائية على ٣٠ فولت.

٤. أطفئ جهاز الطاقة الكهربائية عندما تصل صبغة محلول التحميل إلى حوالي ٢ سم من النهاية الموجبة.

الصبغ والتظهير

١. أزل الهلامة من جهاز الرحلان واغمره في محلول صبغ الايثيديوم بروميد (0.5µg/ml 1X TAE) لمدة ٣٠ د. مع الرج الخفيف.

٢. شاهد الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) وصور الهلامة بكاميرا بولارويد أو بجهاز توثيق الهلامة.

تحذيرات:

١- الايثيديوم بروميد مادة مسرطنة ويجب ألا تتعامل معها أبداً بدون استخدام كفوف بلاستيكية.

٢- الأشعة فوق البنفسجية (UV) تؤذي العيون والجلد. البس واقيات للعيون في كل الأوقات التي تستخدم فيها مصدر الأشعة فوق البنفسجية (UV).

٢.٤.٥. الطرائق العملية للكشف الكيفي /النوعي للذرة والصويا المعدلة باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليمراز العادي

٢.٤.٥.١. الشروط العامة للـ بي سي أر

- **تحضير المزيج الأساسي لتفاعل الـ بي سي أر**

يستخدم جهاز التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR ، بحجم تفاعل ٢٥ ميكرولتر في أنابيب بي سي أر بحجم 0.2 مللتر تحوي 2 µl من الـ دنا وكل مكونات تفاعل PCR و٣٥ دورة (جدول ٣)، حيث تتكون كل دورة من ثلاث مراحل تؤدي إلى تصنيع سلاسل جديدة من الـ DNA.

يبين الجدول (٣) مكونات تفاعل PCR ، بينما يبين الجدول (٤) مراحل عمل PCR

جدول ٣. مكونات تفاعل المزيج الأساسي للـ PCR

Reagent المادة **اللازمة** / الكواشف	التركيز النهائي **Final concentration**
10x PCR buffer محلول واقي بي سي أر	1X
25 mM MgCl2 كلوريد المغنزيوم ٢٥ ميلي مول	1.5 – 2.5 mM
2 mM dNTPs نيوكليوتيدات الـ دنا (الأربعة)	0.2 mM
10 µmol primer (F) بادئ بالاتجاه الصاعد + (اتجاه المجرى)	0.1 - 1µM
10 µmol primer (R) بادئ – بالاتجاه المعاكس	0.1 - 1µM
Taq DNA polymerase 5 unit/µL أنزيم دنا تاغ بوليمراز	2 - 2.5 U
Total إجمالي الحجم	**100 µl**

- **برنامج ا لـ بي سي أر**

يبين الجدول ٤ برنامج ا لـ بي سي أر العام / مراحل عمل التفاعل التسلسلي البوليمرازي المستخدم مع اختلاف درجات الالتحام حسب البادئ المستخدم في التفاعل.

جدول ٤. برنامج ا لـ بي سي أر / زمن ودرجة حرارة وعدد الدورات المستخدمة في التفاعل

	Temperature/ °C درجة حرارة	Time /min. زمن/ دقيقة
Initial denaturation الفك الأولي لسلسلة الـ دنا الثنائية	94	5
Denaturation فك سلسلة الـ دنا الثنائية	94	1
Annealing temperature درجة حرارة التحام البادئ	*	
Extension تركيب سلسلة الـ دنا	72	1
Number of cycles عدد الدورات	35	
Final extension	72	5
	4	∞

* تختلف درجة حرارة الالتحام حسب البادئ المستخدم (جدول ٥).

٢ .٤. ٥. ٢. تحليل نواتج ا لـ بي سي أر

- **الرحلان الكهربائي في الأغاروز Agarose Gel Electrophoresis**

باستخدام هلامة الأغاروز القياسية، يمكن فصل أجزاء الـ دنا بأحجام من 0.1 إلى 25 kb (من أجل فصل أجزاء دنا أكبر حجماً من ١٠-٢٠٠٠ كيلو بيزبير (شفع/زوج نيوكليوتيدي) حسب حجم ال دنا المراد فصله (انظر جدول ٢)، ينصح استخدام الرحلان الكهربائي في حقل كهربائي نبضي).

والرحلان الكهربائي في الأغاروز هو طريقة بسيطة وفعالة جداً من أجل فصل وتحديد وتنقية أجزاء الـ دنا بأحجام مختلفة. تعتمد النسبة المئوية للأغاروز في الهلامة على حجم جزيئات الـ دنا المراد فصلها. حيث تهاجر (ترحل) جزيئة الـ دنا الخيطية ذات الشريط المضاعف ضمن الهلامة بفعل الحقل الكهربائي المطبق بين الكترودي (قطبي) الرحلان من القطب السالب الى القطب الموجب. وتتناسب سرعة هجرة قطع الـ دنا ضمن الهلامة عكسياً مع اللوغاريتم العشري $\log_{10}$ لعدد الأشفاع النيوكليوتيدية المكونة لجزيئة الـ دنا المراد تمريرها ضمن هلامة الأجاروز. حيث يوجد علاقة خطية بين لوغاريتم قابلية حركة جزيئات الـ دنا ضمن الرحلان الكهربائي وتركيز الهلامة (انظر الجدول ٢ أعلاه).

٢ . ٤. ٥. ٣. التجـربة العمليــة

٢ . ٤. ٥. ٣. ١ . مقدمة

تتيح الطرائق التالية المعتمدة على ا ل "بي سي أر" غربلة المواد المعدلة وراثياً (باستخدام المحفز 35S والمنهي *nos*) في المواد الخام والمصنعة بالمقارنة مع عينات مماثلة غير معدلة وراثياً (صويا وذرة). فهي تعطي فقط نتيجة كيفية بالإشارة إلى وجود أو غياب تسلسل محدد للـ دنا المستهدف في العينة.

٢ . ٤. ٥. ٣. ٢ . الأدوات:

- ماصات قياسية دقيقة
- جهاز تدوير حراري "بي سي أر"
- ميكروفيوج (مثفلة/ جهاز طرد مركزي صغير/للأنابيب الصغيرة)
- مازج فورتكس /هزاز
- حامل لأنابيب التفاعل
- أنابيب تفاعل بي سي أر 0.2 مل.
- أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل.
- غرفة معقمة منفصلة مزودة بجهاز أشعة فوق بنفسجية .

ملاحظة:

- كل الأدوات يجب أن تكون خالية من الـ دنا وبالإمكان أن تعقم قبل الاستخدام.
- لتجنب التلوث، يجب استخدام رؤوس ماصات مفلترة للحماية من تشكل الرذاذ /الايروسول.

٢ . ٤. ٥. ٣. ٣ . المواد اللازمة / الكواشف: *Reagents*

- dNTPs نيوكليوزيدات
- محلول منظم /واقي للـ بي سي أر 10x PCR buffe
  (عادة يقدم من نفس الشركة المزودة للأنزيم *Taq* DNA polymerase)
- 5 mM $MgCl_2$
- *Taq* DNA polymerase (5 U/µl)
- بادئات /مرئسات/ أوليغو نيوكليوتيدات متخصصة بالاتجاهين الصاعد والعكسي

Upstream and downstream oligonucleotides

- زيت معدني (ضروري عندما يكون جهاز ا لـ بي سي أر بدون غطاء ساخن)
- ماء خالي من المحلل النووي /النيوكليز(أنزيمات بكتيرية تفكك الـ دنا أوالـ رنا)

محلول أم من نيوكليوزيدات تخليق الـ دنا الـ 4 m M dNTPs

- الـ dNTPs يمكن أن تقدم كمحاليل مركزة ممزوجة مسبقاً تحوي: dATP, dCTP, dGTP, Dttp
  - ادينوزين ثلاثي الفوسفات Adenosine triphosphate (ATP)
  - سيتيدين '٥- ثلاثي الفوسفات Cytidine 5'- triphosphate
  - غوانوزين '٥- ثلاثي الفوسفات Guanosine 5'- triphosphate
  - ديوكسي ثياميدين '٥ - ثلاثي الفوسفات deoxythymidine 5'- triphosphate

بتراكيز متساوية أو تكون منفصلة في محاليل مركزة كل على حدا، وفي هذه الحالة، أذب كل منها في ماء مقطر منزوع الأيونات لتحصل على تركيز محلول نهائي ٤ ميلي مول من الـ dNTP s

- قسمها إلى عدة أجزاء متساوية في أنابيب وخزنها بدرجة -٢٠°م، حيث أنها ثابتة لبضعة أشهر.

محلول البادئات /المرئسات/ بتركيز ٢٠ بيكومول *20 pM primer solution*

عموماً، يقدم اوليغونيوكليوتيد البادئ بشكل مجفف بالتبريد ويجب أن تخفف إلى تركيزنهائي ٢٠ بيكومول.

- حضر محلول بادئ ٢٠ بيكومول حسب تعليمات الشركة المصنعة.
  - 1 pmol/ µl = pM أي 20 pmol/µl= 20 pM
  - Xnmol بادئ + 10X µl ماء مقطر معقم = 100 pmol/ µl =100 pM
    - بيكو مول pM = ١ بيكو مول pmol/ميكروليتر أي
    - ٢٠ بيكومول= ٢٠ بيكومول/ميكروليتر.

- X نانومولnmol من البادئة + ١٠ X ماء معقم = ١٠٠ بيكو مول pM/ ميكروليتر

- حضن لمدة ٥ د. على درجة 65 °م ، رج ثم حضن لمدة ٣ د. أخرى على درجة 65° م
- خفف 1:5 (حضر ١ أنبوب ميكروسنتريفيوج مع 400 µl ماء معقم وأضف 100 µl من محلول البادئ (100 pM) ، التركيز النهائي هو: 20 pM)

- قسم محلول البادئ إلى أقسام في أنابيب صغيرة وخزنها على درجة -٢٠ °م .

الأجزاء المخزنة بدرجة -٢٠ °م تكون ثابتة على الأقل لمدة ستة أشهر، بينما البادئات المجففة بالتبريد المخزنة بدرجة -٢٠ °م ثابتة لمدة حتى ٣ سنوات.

محلول منظم للـ بي سي أر *10x*

- الذي يحوي المكونات التالية:: ***10x*** عادة يقدم محلول منظم لتفاعل الـ بي سي أر

-500 mM KCl

-100 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25°C)

-1% Triton X-100

ويكون جاهز للاستخدام. يجب أن يمزج *Taq* DNA polymerase مع أنزيم البلمرة المحلول الواقي جيداً ويثفل لفترة وجيزة قبل كل استخدام.

- تخزن الأجزاء المتساوية منه على درجة -٢٠ °م ، وهي ثابتة تحافظ على خواصها لبضعة أشهر.

محلول 25 mM MgC12

عموماً، يقدم محلول كلوريد المغنزيوم عالي النقاوة للـ بي سي ار مع أنزيم البلمرة *Taq* DNA polymerase، ويكون جاهز للاستخدام. يجب أن يمزج المحلول (فورتكس) قبل كل استعمال ويوضع بالمثفلة (يثفل) لفترة وجيزة (يتخرب التركيز والذي يمكن أن ينشأ في حال الحفظ لفترة طويلة). خزنه على درجة -٢٠ °م.

ماء مقطر خالي من النيوكليز /أنزيم تحطيم الـ دنا. تحضر أقسام متساوية من الماء المقطر منزوع الأيونات خالي من النيوكليز من أجل المزيج الأساسي للتفاعل Mastermix، ومن أجل تخفيف الـ دنا. يستخدم أنبوب جديد منه لكل سلسلة جديدة من الاختبارات (التحاليل).

١. ٤. ٥. ٣. ٤ . البادئات المستخدمة: البادئات المستخدمة في الدورة هي في الجدول (٥) وهي مصنعة لدى شركة Eurofins MWG GmbH في ألمانيا، وتم الحصول عليها بشكل مجفف بالتبريد وتم حلها في محلول منظم TE قبل الاستخدام للحصول على تركيز نهائي 10 pmol/µl.

جدول ٥. تسلسل أزواج البادئات قليلة النيوكليوتيدات المستخدمة في الكشف عن بعض مكونات المواد المعدلة وراثياً والعنصر المستهدف وحجم "الأمبليكون" المتوقع.

Primer البادئ	Sequences التسلسل	Target gene المورث المستهدف	Amplicon size(bp) حجم الجزء المضخم (أمبليكون) bp	Annealing temperature * درجة حرارة الالتحام
GMO3 GMO4	GCCCTCTACTCCACCCCCATCC GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG	Lectin gene	118	63
ZEIN3 ZEIN4	AGTGCGACCCATATTCCAG GACATTGTGGCATCATCATTT	Zein gene	277	60
P35s-cf3 P35s-cf4	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	35S promoter	123	62
HA-nos118F HA-nos118R	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG GACACCGCGCGCGATAATTTATCC	Nos terminator	118	62
GMO5 GMO9	CCACTGACGTAAGGGATGACG CATGAAGGACCGGTGGGAGAT	EPSPS gene	447	60
GMO7 GMO8	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA TGGGGTTTATGGAAATTGGAA	EPSPS gene	169	60

٢. ٤. ٥. ٣. ٥ . الشاهد / كونترول:

من الضروري إجراء تجربة شاهد في كل تفاعل بي سي أر. ويوضع:

- الشاهد السلبي الذي يوضع فيه الماء بدل الـ دنا القالب لاختبار ما إذا مكونات تفاعل ا لـ بي سي أر ملوثة بالـ دنا.
- الشاهد الايجابي أيضاً ضروري لتحديد كفاءة وتخصصية ا لـ بي سي أر.

جدول ٦. تركيب البلاسميدات المستخدمة كشاهد موجب

The plasmid اسم البلاسميد	plasmid construct تركيب البلاسميد
PGIIMH35-2PS	*35 S pro+ tnos+ bar gene+ g2PS1* gene
TOP10 PGII35S CRYA(b)	*npt* II + *bar* gene + *cry*A(b)
TOP10 PGII35S CRYA©	*npt* II + *bar* gene + *cry*A ©
pBI-121	*npt* II + *gus*A gene
pBI-221	35S *pro*+ *gus*A gene+ *tnos*

٢ .٤. ٥. ٣. ٦. بي سي أر متخصص لكشف مورثة لكتين في فول الصويا

تعد المورثة المشفرة للاكتين lectin gene من المورثات النوعية المميزة لنبات فول الصويا، ويهدف الكشف عن هذه المورثة باستخدام البادئات GMO3/GMO4 (Meyer *et al*., 1996) الى التأكد من صلاحية الـ DNA المستخرج من فول الصويا لإجراء تفاعل الـ KPCR كما يفيد في التأكد من عدم حدوث تلوث في DNA العينات المستخلصة، بالاضافة الى استخدامها كمورثة مرجعية لتحديد نسبة التعديل الوراثي في أي عينة أخرى تحوي فول صويا. لذلك يتم تحديد دنا الصويا باستهداف مورثة اللكتين.

بادئات ا لـ بي سي أر المستخدمة للكشف عن مورثة اللكتين هذه هي: GMO3/GMO4 ٠(جدول ٥). والتي تحدد عندما يكون دنا الصويا الممكن تضخيمه موجود في العينة.

خواص البادئات *GMO3* و *GMO4*

GMO3	
Sequence التسلسل	GCCCTCTACTCCACCCCCATCC
Length (bp) الطول	22
Mol.Weight (g/mol) الوزن الجزيئي (غ/مول)	6471.6
Melting point * (G/C) درجة الانصهار / الذوبان	65.1
GMO4	
Sequence التسلسل	GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG
Length (bp) الطول	23
Mol.Weight (g/mol) الوزن الجزيئي (غ/مول)	6981.1
Melting point * (G/C) درجة الانصهار / الذوبان	59.6

*based on a [Na] of 50 mM

* حسب الصوديوم بتركيز 50 mM

الشاهد/ كونترول

من الضروري إجراء تجربة شاهد في كل تفاعل بي سي أر. ويوضع الشاهد السلبي الذي يوضع فيه الماء بدل الـ دنا القالب لاختبار ما إذا مكونات تفاعل ا ل بي سي أر ملوثة بالـ دنا.

الشاهد الايجابي أيضاً ضروري لتحديد كفاءة وتخصصية ا لـ بي سي أر.

يجب أن تدخل البلاسميدات التالية في تحليل ا لـ بي سي أر و هي:

- الشاهد الموجب : دنا نقي، معزول من صويا تقليدية غير محورة.
- الشاهد السلبي: دنا نقي معزول من أنواع أخرى لا تحتوي على مورثة اللكتين.
- دون دنا: شاهد سلبي من المزيج الأم يضاف له الماء بدل الـ دنا

- **تحضير المزيج الأساسي للتفاعل**

تمزج المواد الكيماوية الضرورية لسلسلة من ١٠ عينات (بما فيها الشاهد السلبي والموجب و بدون دنا قالب) حسب ما هو مبين في (الجدول ٧).

ينطبق الإجراء التالي على عينة تحتوي على 48 pl من المزيج الأم GMO3/GMO4 و 2 pl من محلول دنا. تخزن كل المحاليل على الثلج أثناء تحضير المزيج الأم.

جدول ٧. المزيج الأم GMO3 / GMO4.

	Final concentration التركيز النهائي	**Mastermix for one sample** المزيج الأم لكل عينة (µl)	**Mastermix for 10 samples** المزيج الأم لـ ١٠ عينات (µl)
Sterile, deionised water	lx	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer GMO3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer GMO4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

جدول ٨. برنامج ا لـ بي سي أر

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	63°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Number of cycles (40)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

بعد انتهاء التضخيم، توضع العينة في المثقلة (جهاز الطرد المركزي) لفترة وجيزة، ثم توضع على الثلج.

تحليل نواتج ا لـ بي سي أر

بعد تضخيم تسلسل الـ دنا المستهدف، تحلل نتائج ا لـ بي سي أر من خلال الرحلان الكهربائي بالأغاروز بوجود الايثيديوم بروميد. يمزج 8 pl من ناتج تفاعل ا لـ بي سي أر مع 2 pl من محلول التحميل ثم تحمل العينات على هلامة الأغاروز (1.5%)، ويحمل 15 pl من مؤشر دنا بحجم ١٠٠شفع نيوكليوتيدي في بئر مجاور للعينات المختبرة من أجل التحديد الدقيق لحجم نواتج ا لـ بي سي أر. يجرى الرحلان على ١٠٠ فولت لمدة ساعة. بعد انتهاء الرحلان، يمكن مشاهدة الـ دنا في الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. يتم تصوير الهلامة للحصول على تسجيل دائم لنتيجة التجربة.

تفسير النتائج

يستخدم زوج البادئات GMO3/GMO4 لكشف مورثة اللكتين الأساسية الخاصة بفول الصويا كطريقة اختبار للشاهد، حيث أن وجود حجم حزمة (شريطة) مقداره 118 bp زوج نيوكليوتيدي يؤكد أن الدنا المستخلص هو ذو نوعية مناسبة للتضخيم بالـ بي سي أر.

الشاهد الموجب سوف يعطي حزمة بحجم 118 bp. أما الشاهد السلبي والشاهد الذي لا يحوي دنا قالب (يحوي ماء بدل الـ دنا) يجب ألا يعطي أي حزمة مرئية. وإذا لم يعط الشاهد السلبي والموجب النتائج المتوقعة، فان نتائج أل بي سي أر للعينات المدروسة غير صحيحة/ غير واقعية.

إذا أعطى الشاهد الموجب النتائج المتوقعة والعينات لم تظهر حزمة بحجم 118 bp، فهذا يعني أنه لا يوجد في العينات المختبرة دنا صويا ممكن تضخيمه. يجب ملاحظة أن هذا البروتوكول وبروتوكولات أخرى هي كيفية وبالتالي فهي تعطي فقط نتيجة يوجد أو لا يوجد.

Source: M. Qurci *et al.* 2006 , http://gmotraining.jrc.it

٢ . ٤.٥.٣.٧. بي سي أر متخصص بكشف مورث زين في الذرة
❖ Maize specific PCR: maize-zein

تعد المورثة Zein gene من المورثات النوعية المميزة لنبات الذرة، ويهدف الكشف عن هذه المورثة باستخدام البادئات / المرئسات ZEIN3, ZEIN4 (Studer *et al*.,1997) التأكد من صلاحية الـ DNA المستخرج من الذرة لإجراء تفاعل الـ PCR ، كما يفيد في التأكد من عدم حدوث تلوث في DNA العينات المستخلصة، هذا بالاضافة الى استخدامها كمورثة مرجعية لتحديد نسبة التعديل الوراثي في أي عينة أخرى تحوي ذرة. لذلك يتم تحديد دنا الذرة باستهداف مورثة زين zein.

بادئات ا لـ بي سي أر المستخدمة هي: ZEIN3/ZEIN4 والتي تحدد عندما يكون دنا الذرة الممكن تضخيمه موجود في العينة.

خواص البادئات ZEIN3/ZEIN4

ZEIN3	
Sequence	AGTGCGACCCATATTCCAG
Length (bp)	19
Mol.Weight (g/mol)	5772.3
Melting point * (G/C)	55.2
ZEIN4	
Sequence	GACATTGTGGCATCATCATTT
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6410.9
Melting point * (G/C)	51.7

* حسب الصوديوم بتركيز 50 mM

الشواهد/ كونترول

- الشاهد الموجب : دنا نقي، معزول من ذرة تقليدية غير محورة.
- الشاهد السلبي: دنا نقي معزول من أنواع أخرى لا يحتوي على مورثة زين.
- شاهد دون دنا: شاهد سلبي من المزيج الأم يضاف له الماء بدل الـ دنا

- **تحضير المزيج الأم**

تمزج المواد الكيماوية الضرورية لسلسلة من ١٠ عينات (بما فيها الشاهد السلبي والموجب و بدون دنا قالب) حسب ما هو مبين في (الجدول ٩) أدناه.

ينطبق الإجراء التالي على عينة تحتوي على 48 µl من المزيج الأم ZEIN3/ZEIN4 و 2 µl من محلول الـ دنا. تخزن كل المحاليل على الثلج أثناء تحضير المزيج الأم.

جدول ٩. المزيج الأم ZEIN3/ZEIN4

	Final concentration التركيز النهائي	**Mastermix for one sample** المزيج الأم لكل عينة (µl)	**Mastermix for 10 samples** المزيج الأم لـ١٠ عينات (µl
Sterile, deionised water	1x	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer ZEIN3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer ZEIN4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

- حضر أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل .
- أضف المواد حسب التسلسل المبين في الجدول 2 (أعلاه)
- اخلط بهدوء المزيج ZEIN3/ZEIN4 بالماصة مع تثفيل لفترة وجيزة.
- قسم المزيج الأم إلى أجزاء متساوية قدر 48 pl في أنابيب بي سي أر سعة 0.2 مل.
- أضف 2 pl من محلول الـ دنا لكل واحد من المزائج السابقة.
- رج بهدوء مع تثفيل لفترة وجيزة.
- ضع أنابيب تفاعل ا ل بي سي أر في جهاز التد وير الحراري (جدول ١٠).

(جدول ١٠). **برنامج ا لـ بي سي أر(ZEIN3 / ZEIN4)**

	درجة الحرارة Temperature	الزمن Time
Initial denaturation فك سلسلتي الـ دنا	95°C	3 min
Denaturation فك سلسلتي الـ دنا	96°C	1 min
Annealing الالتحام مع البادئ	60°C	1 min
Number of cycles (40) عدد الدورات 40		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

بعد انتهاء التضخيم، توضع العينة في جهاز المثقلة لفترة وجيزة ثم توضع على الثلج.

تحليل نواتج ا لـ بي سي أر

بعد تضخيم تسلسل الـ دنا المستهدف، تحلل نتائج ا لـ بي سي أر من خلال الرحلان الكهربائي بالاغاروز بوجود الايثيديوم بروميد. يمزج 8 pl من ناتج تفاعل ا لـ بي سي أر مع 2 pl من محلول التحميل، ثم تحمل العينات على هلامة الاغاروز (1.5%) ويحمل 15 pl من مؤشر دنا بحجم ١٠٠ bp في بئر مجاور للعينات المختبرة من أجل التحديد الدقيق لحجم نواتج ا لـ بي سي أر. يجرى الرحلان على ١٠٠ فولت لمدة ساعة. بعد انتهاء الرحلان، يمكن مشاهدة الـ دنا في الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. يتم تصوير الهلامة للحصول على تسجيل دائم لنتيجة التجربة.

تفسير النتائج

يستخدم زوج البادئات ZEIN3/ ZEIN4 لكشف مورثة زين ZEIN الأساسية الخاصة بالذرة كطريقة اختبار للشاهد، حيث إن وجود حجم حزمة (شريطة) مقداره 277 bp شفع/زوج نيوكليوتيدي يؤكد أن الدنا المستخلص هو ذو نوعية مناسبة للتضخيم بالـ بي سي أر.

الشاهد الموجب سوف يعطي حزمة بحجم 277 bp.

الشاهد السلبي والشاهد الذي لا يحوي دنا قالب (يحوي ماء بدل الـ دنا) يجب ألا يعطي أي حزمة مرئية.

إذا لم يعط الشاهد السلبي والموجب النتائج المتوقعة، فان نتائج ال بي سي أر للعينات المدروسة غير صحيحة / غير واقعية.

إذا أعطى الشاهد النتائج المتوقعة والعينات لم تظهر حزمة بحجم 277 bp، فهذا يعني أنه لا يوجد في العينات المختبرة دنا ذرة ممكن تضخيمه.

Source: M. Qurci *et al.* 2006 , http://gmotraining.jrc.it

٢ .٤ .٥ . ٣. ٨. طرائق الغربلة لكشف وجود المحفز 35S ووجود المنهي *nos*

تكون المورثات تحت تحكم المحفزات والمنهيات. أكثر التسلسلات المستخدمة بشكل واسع لتنظيم المورثات المهندسة وراثياً هو المحفز 35S (والذي مصدره فيروس موزاييك القرنبيط/ الزهرة) والمنهي *nos* (والذي مصدره بكتريا التدرن التاجي (أغروباكتريا). ان تحديد/ تعريف واحد من هذه التسلسلات المنظمة للمورثات في الصويا والذرة المحتوية على العينات المختبرة يشير إلى وجود تعديل وراثي في هذه العينات.

في فول الصويا المعدل وراثياً ®Roundup Ready، تحديد وجود كل من المحفز 35S والمنهي *nos* ممكن، حيث يوجد فقط المحفز 35S في سلالات الذرة المهندسة وراثياً Bt-176 وMON810 .

٢. ٤. ٥.٣. ٨.١. كشف وجود المحفز 35S

مواصفات البادئات المستخدمة p35S-cf3 and p35S-cr4

p35S-cf3	
Sequence	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6414.5
Melting point * (G/C)	57.4
p355-cr4	
Sequence	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7544.2
Melting point * (G/C)	56.3

* حسب الصوديوم بتركيز 50 mM

الشواهد/ كونترول

- الشاهد الموجب : دنا من مادة مرجعية (ذرة تحوي 0.5% نسبة تعديل وراثي).
- الشاهد السلبي: دنا من مادة مرجعية (ذرة تحوي ٠ % نسبة تعديل وراثي).
- شاهد دون دنا: شاهد سلبي من المزيج الأم يضاف له الماء بدل الـ دنا
- **تحضير المزيج الأساسي**

تمزج المواد الكيماوية الضرورية لسلسلة من ١٠ عينات (بما فيها الشاهد السلبي والموجب و بدون دنا قالب) حسب ما هو مبين في (الجدول ١١) أدناه .

ينطبق الإجراء التالي على عينة تحتوي على 48 µl من المزيج الأم p35S-cf3/p35S-cr4 و 2 µl من محلول الـ دنا. تخزن كل المحاليل على الثلج أثناء تحضير المزيج الأم.

جدول ١١. المزيج الأم p35S-cf3/p35S-cr4

	Final concentration التركيز النهائي	**Mastermix for one sample** المزيج الأم لكل عينة (µl)	**Mastermix for 10 samples** المزيج الأم لـ١٠ عينات (µl)
Sterile, deionised water	1x	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM MgCl2	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer p35S-cf	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer p35S-cr4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

- حضر أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل .
- أضف المواد حسب التسلسل المبين في الجدول (أعلاه)
- اخلط بهدوء المزيج p355-cf3/p35S-cr4 بالماصة مع تثفيل لفترة وجيزة.
- قسم المزيج الأم إلى أجزاء متساوية قدر 48 µl في أنابيب بي سي آر سعة 0.2 مل.
- أضف 2 µl من محلول الـ دنا لكل واحد من المزائج السابقة.
- رج بهدوء مع تثفيل لفترة وجيزة.
- ضع أنابيب تفاعل ا لـ بي سي أر في جهاز التد وير الحراري "بي سي أر" (جدول ١٢).

(جدول ١٢). **برنامج ا لـ بي سي آر (p35S-cf3/p35S-cr4)**

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	25 sec
Annealing	62°C	30 sec
Extension	72°C	45 sec
Number of cycles (50)		
Final extension	72°C	7 min
	4°C	∞

تحليل نواتج ا لـ بي سي أر

بعد تضخيم تسلسل الـ دنا المستهدف، تحلل نتائج ا لـ بي سي أر من خلال الرحلان الكهربائي بالأغاروز بوجود الايثيديوم بروميد. يمزج 8 pl من ناتج تفاعل ا لـ بي سي أر مع 2 pl من محلول التحميل، ثم تحمل العينات على هلامة الأغاروز (2.5%)، ويحمل 15 pl من مؤشر دنا بحجم ١٠٠ bp في بئر مجاور للعينات المختبرة من أجل التحديد الدقيق لحجم نواتج ا لـ بي سي أر. يجرى الرحلان على ١٠٠ فولت لمدة ساعة. بعد انتهاء الرحلان، يمكن مشاهدة الـ دنا في الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. يتم تصوير الهلامة للحصول على تسجيل دائم لنتيجة التجربة.

تفسير النتائج

يستخدم زوج البادئات pair p355-cf3/p35S-cr4 لكشف المحفز CaMV 35S والذي يعطي حزمة بحجم 123 bp شفع/زوج نيوكليوتيدي. ينظم هذا المحفز تعبير المورثة في الكثير من النباتات المهندسة وراثياً مثل الصويا Roundup Ready® وسلالة الذرة Bt-176

الشاهد الموجب سوف يعطي حزمة بحجم 123 bp

الشاهد السلبي والشاهد الذي لا يحوي دنا (يحوي ماء بدل الـ دنا) يجب ألا يعطي أي حزمة مرئية.

إذا لم يعط الشاهد السلبي والموجب النتائج المتوقعة، فان نتائج الـ بي سي أر للعينات المدروسة غير صحيحة/ غير واقعية. إذا أعطى الشاهد النتائج المتوقعة و أظهرت العينات حزمة بحجم 123 bp ، فهذا يعني أنه في هذه العينة يوجد دنا معدل وراثياً.

٢. ٤. ٥.٣. ٨.٢. كشف وجود المنهي nos

مواصفات البادئات HA-nos 118-f and HA-nos 118-r

HA-nos 118-f	
Sequence	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG
Length (bp)	24
Mol.Weight (g/mol)	7462.8
Melting point * (G/C)	56.2
HA-nos 118-r	
Sequence	GACACCGCGCGCGATAATTTATCC
Length (bp)	24
Mol.Weight (g/mol)	7296.9
Melting point * (G/C)	61.2

* حسب الصوديوم بتركيز 50 mM

جدول ١٣. المزيج الأم HA-nos118-f/HA-nos118-r

	Final concentration التركيز النهائي	**Mastermix for one sample** المزيج الأم لكل عينة (µl)	**Mastermix for 10 samples** المزيج الأم لـ١٠ عينات (µl)
Sterile, deionised water	lx	32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	2.5 mM	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	0.2 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM primer	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM primer p35S-cr4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/ µl	0.25 µl	2.5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

- حضر أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل .
- أضف المواد حسب التسلسل المبين في الجدول 4 (أعلاه)
- اخلط بهدوء المزيج HA-nos118-f/HA-nos118-r بالماصة مع تثفيل لفترة وجيزة.
- قسم المزيج الأم إلى أجزاء متساوية قدر 48 µl في أنابيب بي سي أر سعة 0.2 مل.
- أضف 2 µl من محلول الـ دنا لكل واحد من المزائج السابقة.
- رج بهدوء مع تثفيل لفترة وجيزة.
- ضع أنابيب تفاعل ا ل بي سي آر في جهاز التد وير الحراري "بي سي أر" (جدول ١٤).

(جدول ١٤). **برنامج ا لـ بي سي أر** ***(HA-nos118-f/HA-nos118-r)***

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	25 sec
Annealing	62°C	30 sec
Extension	72°C	45 sec
Number of cycles (50)		
Final extension	72°C	7 min
	4°C	∞

بعد انتهاء التضخيم، توضع العينة في جهاز المثقلة لفترة وجيزة ثم توضع على الثلج.

تحليل نواتج ا لـ بي سي أر

بعد تضخيم تسلسل الـ دنا المستهدف، تحلل نتائج ا لـ بي سي أر من خلال الرحلان الكهربائي بالاغاروز بوجود الايثيديوم بروميد. يمزج 8 pl من ناتج تفاعل ا لـ بي سي أر مع 2 pl من محلول التحميل، ثم تحمل العينات على هلامة الاغاروز (2.5%)، ويحمل 15 pl من مؤشر دنا بحجم ١٠٠ bp في بئر مجاور للعينات المختبرة من أجل التحديد الدقيق لحجم نواتج ا لـ بي سي أر. يجرى الرحلان على ١٠٠ فولت لمدة ساعة. بعد انتهاء الرحلان، يمكن مشاهدة الـ دنا في الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. يتم تصوير الهلامة للحصول على تسجيل دائم لنتيجة التجربة.

تفسير النتائج

يستخدم زوج البادئات HA-nos118-f/HA-nos118-r لكشف مورثة المنهي *nos* معطية قطعة دنا بحجم 118 bp. هذا المنهي موجود في الصويا Roundup Ready® وسلالات أخرى من النباتات المهندسة وراثياً (مثل سلالة الذرة Bt-11).

الشاهد الموجب سوف يعطي حزمة بحجم 118 bp.

الشاهد السلبي والشاهد الذي لا يحوي قالب دنا (يحوي ماء بدل الـ دنا) يجب ألا يعطي أي حزمة مرئية.

إذا لم يعط الشاهد السلبي والموجب النتائج المتوقعة، فان نتائج الـ بي سي أر للعينات المدروسة غير صحيحة / غير واقعية.

إذا أعطى الشاهد النتائج المتوقعة وأظهرت العينات حزمة بحجم 118 bp، فهذا يعني أنه في هذه العينة يوجد دنا معدل وراثياً.

Source: M. Qurci *et al.* 2006 , http://gmotraining.jrc.it

٢.٤.٦. الكشف المتخصص بالـذرة MON810 والصويا Roundup Ready® باستخدام الـ nested بي سي أر المتداخل/ المعشش

٢.٤.٦.١. كشـــف الـذرة MON810

طريقة الكشف التالية هي مخصصة لكشف الذرة **MON810**. العناصر المستهدفة هي المحفز **CaMV 35S** ومنطقة المورثة **hsp70 exonl/intron**، وهي تسلسلات منظمة بنيوية دائمة التعبير ومورثة بروتين الصدمة الحرارية من أجل زيادة مستوى النسخ على التوالي.

مواصفات البادئات *mgt, mg2, mg3, mg4*

mg 1	
Sequence	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7665.1
Melting point * (G/C)	59.6
mg 2	
Sequence	TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7560.2
Melting point * (G/C)	57.9
mg 3	
Sequence	ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7472.2
Melting point * (G/C)	61.2
mg 4	
Sequence	GCATTCAGAGAAACGTGGCAGTAAC
Length (bp)	25
Mol.Weight (g/mol)	7722.9
Melting point * (G/C)	59.6

* حسب الصوديوم بتركيز 50 mM

الشواهد/ كونترول

- الشاهد الموجب : دنا من مادة مرجعية (MON810/ 0.1%)
- الشاهد السلبي: دنا من مادة مرجعية (ذرة تحوي 0% نسبة تعديل وراثي).
- شاهد دون دنا: شاهد سلبي من المزيج الأم يضاف له الماء بدل الـ دنا

- **تحضير المزيج الأساسي رقم ١**

تمزج المواد الكيماوية الضرورية لسلسلة من ١٠ عينات (بما فيها الشاهد السلبي والموجب وبدون دنا قالب) حسب ما هو مبين في (الجدول ١٥) أدناه.

ينطبق الإجراء التالي على عينة تحتوي على 48 pl من المزيج الأم mg1/mg2 و 2 pl من محلول الـ دنا. تخزن كل المحاليل على الثلج أثناء تحضير المزيج الأم.

جدول١٥. المزيج الأساسي mg1 / mg2

	Final concentration التركيز النهائي	Mastermix for one sample المزيج الأم لكل عينة (µl)	Mastermix for 10 samples المزيج الأم لـ١٠ عينات (µl)
Sterile, deionised water		32.75 µl	327.5 µl
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonucleotide mg1	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonucleotide mg2	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		48 µl	480 µl

- حضر أنابيب ميكروفيوج سعة 1.5 مل .
- أضف المواد حسب التسلسل المبين في الجدول ٦ (أعلاه)
- اخلط بهدوء المزيج mg1/mg2 بالماصة مع تثفيل لفترة وجيزة.
- قسم المزيج الأم إلى أجزاء متساوية قدر 48 µl في أنابيب بي سي أر سعة 0.2 مل.
- أضف 2 µl من محلول الـ دنا لكل واحد من المزائج السابقة.
- رج بهدوء مع تثفيل لفترة وجيزة.
- ضع أنابيب تفاعل ا لـ بي سي أر في جهاز التد وير الحراري "بي سي أر" (جدول ١٦).

(جدول ١٦). **برنامج ا لـ بي سي أر للبادئات (mg1/mg2)**

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	45 sec
Annealing	60°C	50 sec
Extension	72°C	50 sec
Number of cycles (35)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

بعد انتهاء التضخيم، توضع العينة في جهاز المثفلة لفترة وجيزة ثم توضع على الثلج.

- **تحضير المزيج الأساسي ٢**

تمزج المواد الكيماوية الضرورية لسلسلة من ١٠ عينات (بما فيها الشاهد السلبي والموجب والشاهد بدون دنا قالب) حسب ما هو مبين في (الجدول ١٧) أدناه.

ينطبق الإجراء التالي على عينة تحتوي على 48 µl من المزيج الأم mg3/mg4 و ١µl من محلول الـ دنا المضخم مسبقاً من ناتج ا لـ بي سي أر الأول. تخزن كل المحاليل على الثلج أثناء تحضير المزيج الأم.

جدول١٧. المزيج الأساسي mg 3/mg 4 .

	Final concentration لتركيز النهائي	Mastermix for one sample المزيج الأم لكل عينة (µl)	Mastermix for 10 samples المزيج الأم لـ١٠ عينات (µl)
Sterile, deionised water		33.75 µl	337.5 µl
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonucleotide mg3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonucleotide mg4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		**49 µl**	**490 µl**

- حضر أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل .
- أضف المواد حسب التسلسل المبين في الجدول أعلاه.
- اخلط بهدوء المزيج mg3/mg4 بالماصة مع تثفيل لفترة وجيزة.
- قسم المزيج الأساسي إلى أجزاء متساوية قدر 48 µl في أنابيب بي سي أر سعة 0.2 مل.
- أضف 2 µl من محلول الـ دنا لكل واحد من المزائج السابقة.
- رج بهدوء مع تثفيل لفترة وجيزة.
- ضع أنابيب تفاعل ا لـ بي سي أر في جهاز التد وير الحراري "بي سي أر" (جدول ١٨).

(جدول ١٨). **برنامج ا لـ nested بي سي أر *(mg3-mg4)***

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	45 sec
Annealing	60°C	50 sec
Extension	72°C	50 sec
Number of cycles	40	
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

بعد انتهاء التضخيم، توضع العينة في المثفلة لفترة وجيزة ثم توضع على الثلج.

تحليل نواتج ا لـ بي سي أر

بعد تضخيم تسلسل الـ دنا المستهدف، تحلل نتائج ا لـ بي سي أر من خلال الرحلان الكهربائي بالأغاروز بوجود الايثيديوم بروميد. يمزج 8 pl من ناتج تفاعل ا لـ بي سي أر مع 2 pl من سائل التحميل ثم تحمل العينات على هلامة الاغاروز (2.5%) ويحمل 15 pl من مؤشر دنا بحجم ١٠٠ bp في بئر مجاور للعينات المختبرة من أجل التحديد الدقيق لحجم نواتج ا لـ بي سي أر (أمبليكون). يجرى الرحلان على ١٠٠ فولت لمدة ساعة. بعد انتهاء الرحلان، يمكن مشاهدة الـ دنا في الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. يتم تصوير الهلامة للحصول على تسجيل دائم لنتيجة التجربة.

تفسير النتائج

صمم زوج البادئات **mg1/mg2** و **mg3/mg4** للكشف التخصصي للسلالة المهندسة وراثياً **MON810** بوساطة الـ **nested بي سي أر** المتداخل/ المعشش معطية قطعة بحجم 149 bp. التخصصية ناشئة من حقيقة أن البادئات مصممة على المنطقة الممتدة من المحفز 355- و المورثة hsp70 exon/intron.

الشاهد الموجب سوف يعطي حزمة بحجم 149 bp.

الشاهد السلبي والشاهد الذي لا يحوي دنا قالب (يحوي ماء بدل الـ دنا) يجب ألا يعطي أي حزمة مرئية.

إذا لم يعط الشاهد السلبي والموجب النتائج المتوقعة، فان نتائج الـ بي سي أر للعينات المدروسة غير صحيحة / غير واقعية. إذا أعطى الشاهد النتائج المتوقعة و أظهرت العينات حزمة بحجم 149 bp، فهذا يعني أنه في هذه العينة يوجد دنا الذرة سلالة MON810 المعدل وراثياً. (Querci *et al.* 2006)

http://gmotraining.jrc.it

٢. ٤. ٦. ٢. كشف الصويا Roundup Ready®

الهدف هو المورثة CP4 *EPSPS* والتي تضفي صفة تحمل مبيد الأعشاب Roundup®

مواصفات البادئات GMO5, GMO9, GMO7 and GMO8

GMO5	
Sequence	CCACTGACGTAAGGGATGACG
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6479.4
Melting point * (G/C)	59.5
GMO9	
Sequence	CATGAAGGACCGGTGGGAGAT
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6559.4
Melting point * (G/C)	59.5
GMO7	
Sequence	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6309.6
Melting point * (G/C)	55.8
GMO8	
Sequence	TGGGGTTTATGGAAATTGGAA
Length (bp)	21
Mol.Weight (g/mol)	6579.8
Melting point * (G/C)	51.7

* حسب الصوديوم بتركيز 50 mM

الشواهد/ كونترول

- الشاهد الموجب: دنا من مادة مرجعية (صويا معدلة وراثياً بنسبة 0.1% RRS).
- الشاهد السلبي: دنا من مادة مرجعية (صويا تحوي 0% نسبة تعديل وراثياً).
- شاهد دون دنا: شاهد سلبي من المزيج الأم يضاف له الماء بدل الـ دنا.

تحضير المزيج الأساسي/الأم ١

تمزج المواد الكيماوية الضرورية لسلسلة من ١٠ عينات (بما فيها الشاهد السلبي والموجب وبدون دنا قالب) حسب ما هو مبين في (الجدول ١٩) أدناه.

ينطبق الإجراء التالي على عينة تحتوي على 48 µl من المزيج الأم GMO5/GMO9 و 2 µl من محلول الـ دنا. تخزن كل المحاليل على الثلج أثناء تحضير المزيج الأم.

جدول ١٩. المزيج الأساسي GMO5/GMO9

	Final concentration التركيز النهائي	Mastermix for one sample المزيج الأم لكل عينة (µl)	Mastermix for 10 samples المزيج الأم لـ١٠ عينات (µl)
Sterile, deionised water		33.75 µl	337.5 µl
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 pM oligonucleotide GMO5	0.5 pM	1.25 µl	12.5 µl
20 pM oligonucleotide GMO9	0.5 pM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		**49 µl**	**490 µl**

- حضر أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل .
- أضف المواد حسب التسلسل المبين في الجدول ١٩ أعلاه
- اخلط بهدوء المزيج GMO5/GMO9 بالماصة مع تثفيل لفترة وجيزة.
- قسم المزيج الأساسي إلى أجزاء متساوية قدر 48 µl في أنابيب بي سي أر سعة 0.2 مل.
- أضف 2 µl من محلول الـ دنا لكل واحد من المزائج السابقة.
- رج بهدوء مع تثفيل لفترة وجيزة.
- ضع أنابيب تفاعل ا لـ بي سي أر في جهاز التد وير الحراري "بي سي أر" (جدول ٢٠).

(جدول ٢٠). **برنامج ا لـ بي سي أر**(GMO5/GMO9)

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	60°C	30 sec
Extension	72°C	40 sec
Number of cycles (25)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

بعد انتهاء التضخيم، توضع العينة في المثفلة لفترة وجيزة ثم توضع على الثلج.

تحضير المزيج الأساسي رقم ٢

تمزج المواد الكيماوية الضرورية لسلسلة من ١٠ عينات (بما فيها الشاهد السلبي والموجب والشاهد بدون دنا قالب) حسب ما هو مبين في (الجدول ٢١) أدناه.

ينطبق الإجراء التالي على عينة تحتوي على 48 µl من المزيج الأم GMO7/GMO8 و 1 µl من محلول الـ دنا المضخم مسبقاً من ناتج ا لـ بي سي أر الأول. تخزن كل المحاليل على الثلج أثناء تحضير المزيج الأم.

جدول ٢١ المزيج الأم GMO7/GMO8

	Final concentration التركيز النهائي	Mastermix for one sample المزيج الأم لكل عينة (µl)	Mastermix for 10 samples المزيج الأم لـ١٠ عينات (µl)
10x PCR Buffer	1x	5 µl	50 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 pM oligonucleotide GMO7	0.5 pM	1.25 µl	12.5 µl
20 pM oligonucleotide GMO8	0.5 pM	1.25 µl	12.5 µl
Taq DNA polymerase	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
Total		**49 µl**	**490 µl**

- حضر أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل .

- أضف المواد حسب التسلسل المبين في الجدول ٢١ أعلاه.
- اخلط بهدوء المزيج GM07/GM08 بالماصة مع تثفيل لفترة وجيزة.
- قسم المزيج الأساسي إلى أجزاء متساوية قدر 49 µl في أنابيب بي سي أر سعة 0.2 مل.
- أضف 1µl من محلول الـ دنا لكل واحد من المزائج السابقة.
- رج بهدوء مع تثفيل لفترة وجيزة.
- ضع أنابيب تفاعل ا لـ بي سي أر في جهاز التد وير الحراري "بي سي أر" (جدول ٢٢).

(جدول ٢٢). **برنامج ا لـ بي سي أر** المتداخل/ المعشش (GMO7/GMO8)

	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	60°C	30 sec
Extension	72°C	40 sec
Number of cycles (35)		
Final extension	72°C	3 min
	4°C	∞

بعد انتهاء التضخيم، توضع العينة في المثفلة لفترة وجيزة ثم توضع على الثلج.

تحليل نواتج ا لـ بي سي أر

بعد تضخيم تسلسل الـ دنا المستهدف، تحلل نتائج ا لـ بي سي أر من خلال الرحلان الكهربائي بالأغاروز بوجود الايثيديوم بروميد. يمزج 8 µl من ناتج تفاعل ا لـ بي سي أر مع 2 µl من سائل التحميل، ثم تحمل العينات على هلامة الأغاروز (2.5%)، ويحمل 15 µl من مؤشر دنا بحجم ١٠٠ bp في بئر مجاور للعينات المختبرة من أجل التحديد الدقيق لحجم نواتج ا ل بي سي أر. يجرى الرحلان على ١٠٠ فولت لمدة ساعة. بعد انتهاء الرحلان، يمكن مشاهدة الـ دنا في الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. يتم تصوير الهلامة للحصول على تسجيل دائم لنتيجة التجربة.

تفسير النتائج

صمم زوج البادئات GM05/GM09 و GM07/GM08 للكشف التخصصي لمورثة في مركب الدنا المأشوب الخاص في سلالة الصويا المهندسة وراثياً Roundup Ready® بوساطة الـ **nested بي سي أر** المتداخل معطية قطعة داخلية بحجم 169 bp. البادئات GMO5 وGMO7 هي تكميلية للمحفز CaMV 35S، يتهجن البادئ GMO9 مع المورثة CP4 EPSPS في سلالة الأغروباكتريا CP4 وGMO8 يتهجن مع المورثة CTP EPSPS.

الشاهد الموجب سوف يعطي حزمة بحجم 169 bp .

الشاهد السلبي والشاهد الذي لا يحوي دنا قالب (يحوي ماء بدل الـ دنا) يجب ألا يعطي أي حزمة مرئية.

إذا لم يعط الشاهد السلبي والموجب النتائج المتوقعة، فان نتائج الـ بي سي أر للعينات المدروسة غير صحيحة / غير واقعية.

إذا أعطى الشاهد النتائج المتوقعة و أظهرت العينات حزمة بحجم 169 bp، فهذا يعني أنه في هذه العينة يوجد دنا صويا سلالة Roundup Ready® المعدل وراثياً.

Source: M. Qurci *et al.* 2006 , http://gmotraining.jrc.it

٢. ٤. ٧. الكشف / التحديد الكمي عن فول الصويا المعدلة وراثياً Roundup Ready® بوساطة الـ التفاعل السلسلي البوليميرازي "بي سي أر" المتعدد بالزمن الحقيقي

Quantitative of Roundup Ready® Soybean by Multiplex Real-time PCR

مقــدمــة:

الطرائق/ البروتوكولات التالية هي طرائق معتمدة على ا لـ بي سي أر بالزمن الحقيقي لتحديد النسب الكمية للتعديل الوراثي في سلالة فو ل الصويا المعدلة وراثياً (Roundup Ready®) في المادة الخام والمصنعة. نفذ التحديد الكمي بالـ بي سي أر بالزمن الحقيقي باستخدام جهاز التدوير الحراري المجهز لكشف التضخيم بالزمن الحقيقي بقياس التوهج fluorescence الناتج عن التفاعل. الجهاز المستخدم هو ABI PRISM® 7500 SDS من شركة Applied Biosystems.

يستخدم ا لـ بي سي أر بالزمن الحقيقي لماثرة /تضخيم تسلسل دنا مستهدف أساسي هو جزء من النبات (وهو مميز فقط لفول الصويا)، بالإضافة إلى تسلسل الـ دنا المستهدف والذي يوجد فقط في الصويا المعدلة وراثياً (Roundup Ready®). كلا الاختبارين يتضمن نظامي بي سي أر مختلفين، كلاهما يتم باستخدام بادئات متخصصة بالـ دنا المستهدف ومسبار توهج معلم بالصبغ dye-labelled probes. يكشف التفاعل الأول للـ بي سي أر تسلسل الـ دنا المستهدف الخاص بالكائنات المعدلة وراثياً، ويكشف التفاعل الثاني المورثة التي من أصل الجينوم endogenous وهو مصمم ليخدم كمرجع كمي يكشف الصويا المعدلة وراثياً وغير المعدلة.

ملاحظة: البروتوكولات المذكورة هنا اختيرت لأغراض تعليمية ويجب أن تعتبر كأمثلة أساسية للتحديد الكمي للمواد المعدلة وراثياً باستخدام ا لـ بي سي أر بالزمن الحقيقي. ننصح بمراجعة دورية للمصادر والمراجع ذات الصلة للحصول على المعلومات الأحدث عن البروتوكولات الموثقة والمطورة حديثاً. أيضاً، يرجى ملاحظة أن هذه البروتوكولات اختيرت حسب الأجهزة المتوفرة في مخابرنا. وعموماً، هذا لا يعني ولا بأي شكل أن مركز البحوث المشتركة للاتحاد الأوروبي ومنظمة الصحة العالمية والجهات المنظمة لهذه الدورة تدعم أي شركة أو أي نوع بي سي أر.

Real-time PCR using the ABI PRISM® 7500

بي سي أر بالزمن الحقيقي باستخدام جهاز ABI PRISM® 7500 لكشف فول الصويا RR المعدلة وراثياً

- **المصطلحات المستخدمة** ***Terms for Prism7500***

١. التقييم النسبي Relative quantification: يحدد التغيرات في تعبير expression العينة target sample الهف بالنسبة لعينة الشاهد control sample (مثال عينة غير معاملة بالمقارنة مع المعاملة أو تغير التعبير مع الوقت بالمقارنة مع الزمن ٠). يستخدم هذا التقييم عادة لمقارنة مستويات التعبير لمورثة ما في الأنسجة المختلفة في النمط البري wild type بالمقارنة مع الطافرة mutant.

٢. التقييم غير النسبي أو المطلق Absolute quantification: يحدد بواسطته كامل الكمية لهدف وحيد في عينة مجهولة. باستخدام التفاعل السلسلي البوليميرازي بالوقت الحقيقي نقوم برصد التقدم الذي يحدث في مراحل التفاعل وجمع البيانات في كل مرحلة من هذه المراحل وليس في نهاية التفاعل كما يحدث في الـ PCR العادي. إذا أردنا رسم خط بياني عندها يستخدم التقييم المطلق.

٣. يتميز التفاعل السلسلي البوليميرازي بالوقت الحقيقي بأنه يعتمد خلال عملية التدوير على الزمن في الدلالة على حدوث عملية التضاعف منذ بداية الكشف عن السلسلة المستهدفة، ولا يحتاج إلى تراكم ناتج هذا التضاعف في نهاية التفاعل كما في الـ PCR العادي.

٤. الصباغ الدال Reporter dye: هو عبارة عن الصباغ (مولد التوهج) الذي تم ربطه إلى النهاية 5' في سلسلة المسبر تاك مان TaqMan probe.

٥. الكاشف Detector:

٦. الخط الأساس Baseline: عبارة عن الدورات الابتدائية للـ PCR التي يحدث فيها تغيرات طفيفة في إشارة التوهج.

٧. NTC: شاهد بدون DNA قالب No Template Control وهي عينة لا تحتوي على DNA قالب تستخدم في تأكيد نوعية التفاعل.

٨. قياسي Standard: عينة معلومة الكمية تستخدم لرسم المنحنى القياسي.

٩. المرجع السلبي Passive reference: وهو عبارة عن صباغ dye يعطي توهج داخلي يفيد في معادلة الإشارة الناتجة عن الصباغ الدال خلال تحليل النتائج. المرجع السلبي شائع الاستخدام هو ROX ويوجد عادة في المزيج الأساسي تاك مان TaqMan Master mix.

١٠. تعادل الدال Normalized reporter (Rn): وهو عبارة عن النسبة بين كثافة انبعاث التوهج من الصباغ الدال reporter dye إلى كثافة انبعاث التوهج من المرجع السلبي passive reference.

بروتوكول لكشف فول الصويا RR المعدلة وراثياً بالـ بي سي أر بالزمن الحقيقي باستخدام جهاز ABI PRISM® 7500:

طريقة بي سي أر المتزامن ثنائية أزواج البادئات. تتألف هذه الطريقة من تضخيم / والتحديد الكمي للمورثة الأساسية/ المرجعية وهي اللكتين وجزء من البلاسميد المركب المدخل في الصويا RR باستخدام اختبار بي سي أر ثنائي زوج البادئات (تفاعلي بي سي أر في نفس الأنبوب) (Onori *et al.*, submitted). مورثة اللكتين TaqMan ومسابر الصويا RR معلمة بالصبغ VIC والصبغ FAM على التوالي، مما يتيح إمكانية كشف التضخيم لأكثر من هدف في نفس الأنبوب. الصبغة المخبرة FAM يمكن تمييزها عن الصبغة VIC بسبب اختلاف أطوال موجات إشعاعاتها العظمى. الجهاز ABI PRISM® 7700 SDS قادر على كشف صبغ ذوات أطوال موجات إشعاع متمايزة. كمية صبغة FAM في الصويا RR تجعل مطابقة لسوية معينة في صبغة VIC المكتشفة في كل عينة. وهذا ينتج قيمة ACT والتي هي متوسط لمكررات العينات. تقارن هذه القيم مع منحنى مقياسي/ معياري ناتج من قيم ACT لتراكيز قياسية معروفة من الصويا RR (طريقة ال CT أو الAACT النسبية).

طبقت هذه الطريقة بنجاح لمواد خام ومكونات مواد وأغذية تحوي صويا (مثل: علف، شراب صويا، يوغورت (لبن)، طحين، ليستين، وغيرها).

تمت مراقبة الأداء التحليلي للطريقة من خلال عدة مخططات اختبارات كفاءة (مثل: FAPAS®، و GIPSA).

الأدوات والكيماويات

- جهاز السلسلة ABI ® 7500 (شركة Applied Biosystems).
- أطباق تفاعل ضوئية ذات ٩٦ حفرة /بئر (Cat No. N801- MicroAmp Optical 0560)
- أغطية ضوئية للأطباق (Cat No. N801-0935) MicroAmp Optical
- مزيج التفاعل الأساسي بقوة مضاعفة (٢×) للـ بي سي أر عام ®TaqMan (Cat No. 4304437 2X) يحوي :

  محلول منظم للتفاعل (٢×) TaqMan Buffer،

  أنزيم البلمرة (5U/µ1) AmpliTaq Gold® DNA Polymerase،

  AmpErase® UNG (1U/m1)،

  ٢٠٠ ميكرومولر نيوكليوزيدات dNTPs مع dUTP،

  مرجع سلبي Passive Reference

- أنابيب تثفيل ميكروسنتريفيوج سعة 1.5 مل
- مثفلة/ جهاز طرد مركزي مبرد لأنابيب مخروطية /فالكون سعة 15 مل
- ماصات قياسية دقيقة
- مازج فورتكس
- حامل لأنابيب التفاعل
- أنابيب تثفيل سنتريفيوج بولي بروبيللين مخروطية الشكل سعة 15 مل
- ماء مقطر خالي من النوكليز
- بادئات متخصصة بالمورثة المرجعية (الأساسية) (Le-F and Le-R) والمسبار (Le-Probe)
- بادئات متخصصة بالمورثة المهندسة وراثيا (RR-F and RR-R) والمسبار (RR-Probe)

مواصفات البادئات والمسبار للمورثة المرجعية

Le- F

Sequence	TCC ACC CCC ATC CAC ATT T
Length (bp)	19
Mol. weight	5586.0

Le-R

Sequence	GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA
Length (bp)	24
Mol. Weight	7532

Le-Probe

Sequence	5'-(VIC)-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG-(TAM RA)-3'
Length (bp)	23
Mol. weight	7019.0

مواصفات البادئات والمسبار للمورثة المهندسة وراثياً

RRF

Sequence	GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT
Length (bp)	23
Mol. Weight	7014

RR-R

Sequence	GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C
Length (bp)	25
Mol. Weight	7712

RR-Probe

Sequence	5'-(FAM)-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG-(TAMRA)-3'
Length (bp)	33
Mol. Weight	10137

تحضير المزيج الأساسي

- أذب، امزج مع تثفيل خفيف للكميات المطلوبة للتفاعل. احفظ الكميات المذابة على الثلج.
- لتحضير المزيج الأم، أضف المكونات التالية حسب التسلسل المذكور (جدول ٢٣) (ما عدا الـ دنا) في أنبوب تثفيل سنتريفيوج سعة 15 مل محفوظ على الثلج. يحلل كل دنا تم استخلاصه في ثلاث مكررات. (جدول٢٣).

يرجى ملاحظة أن يتم إعداد أربعة مزائج إضافية للمساعدة في حساب الأخطاء الناجمة عن استخدام الماصات بسبب كثافة/ لزوجة المحلول

جدول ٢٣. تحضير المزيج الأم لطبق واحد باختبار ا لـ بي سي أر ثنائي البادئات

	Concentration in PCR التركيز في ا لـ بي سي أر	**Mastermix for one reaction vessel (µl)** المزيج الأم لأنبوب واحد **(µl)**	**Mastermix for one sample (3 repititions)** المزيج الأم لعينة واحدة (٣ مكررات)	**Mastermix for one plate (32+4 samples)** المزيج الأم لطبق واحد (٣٢ + ٤ عينة)
Sterile, deionised water		18.3	54.9	1976.4
TaqMan Universal Mastermix (2x)	lx	25	75	2700
Primer Le-F (20 µM)	40 nM	0.1	0.3	10.8
Primer Le-R (20 µM)	40 nM	0.1	0.3	10.8
Primer RR-F (20 µM)	100 nM	0.25	0.75	27
Primer RR-R (20 µM)	100 nM	0.25	0.75	27
Le-Probe (10 µM)	100 nM	0.5	1.5	54
RR-Probe (10 µM)	100 nM	0.5	1.5	54
DNA	50-250 ng	5	**15**	
TOTAL		50	**150**	

- امزج بلطف وثفل لفترة وجيزة.
- حضر أنابيب تثفيل ميكروفيوج سعة 1.5 مل لكل عينة دنا مراد اختباره: عينات المنحنى القياسي (مواد مرجعية موثقة من الصويا RR بتراكيز(0.1, 0.5, 1, 2, 5%)، عينات مجهولة وعينات الشاهد (صويا RR 0%، دنا من الصويا RR، وشاهد من دول دنا قالب (ماء بدل دنا).
- أضف إلى كل أنبوب الكمية المحددة من المزيج الأم والضرورية لـ ٣ مكررات (**µl** 135 من المزيج الأم). أضف لكل أنبوب الكمية المطلوبة من الـ دنا لـ ٣ مكررات (أي **µl** 15 دنا). امزج بالفورتكس كل أنبوب على الأقل ٣ مرات لمدة حوالي ١٠ ثواني. هذه الخطوة ذات أهمية خاصة، لأنها تساعد في التقليل من التباين بين المكررات الأربعة لكل عينة.

تثفيل لفترة وجيزة بالميكروسنتريفيوج. ضع الطبق ذو الـ ٩٦ بئر/حفرة في المركز ثم وزع في كل بئر **µl** 50 أفقياً من اليسار إلى اليمين. بعد إضافة المزيج الأم إلى كل صف عمودي من الآبار، غط الآبار بالأغطية الشفافة باستخدام أداة تثبيت الغطاء.

ملاحظات هامة:

- لا تكتب على الطبق الشفاف ولا تلمس الغطاء.
- تأكد من أن المزيج الأم الموزع موجود في قعر الآبار وبدون تطريش أو فقاعات على الجوانب أو في الأغطية.
- ضع الطبق في جهاز الـ ABI PRISM® 7700 ، افتح نافذة (في برنامج الكومبيوتر) للطبق الجديد لتعيين نوع العينة بكل بئر: نوع العينة IPC هو مترافق مع الصبغة VIC و الـ UNKN على طبقة صبغة FAM .
- شغل جهاز ا لـ بي سي أر بالزمن الحقيقي حسب برنامج الدورات الموصوفة في (الجدول ٢٤).

جدول ٢٤. برنامج ا لـ بي سي أر لاختبار الصويا RR ثنائي البادئات في جهاز ABI PRISM® 7700 SDS في تفاعل بي سي أر بالزمن الحقيقي

Step	Stage		T°C	Time	Acquisition	Cycles
1	U NG		50°C	120 sec	no	lx
2	Initial denaturation		95°C	60 sec	no	lx
3	Amplification	Denaturation	95°C	15 sec	no	45x
4		Annealing & Extension	60°C	60 sec	Measure	

- **إعداد الجهاز للتشغيل عند استخدام مسبر موسوم**

١. تجهيز عينات التفاعل
٢. تثبيت الغطاء بقوة
٣. تشغيل جهاز التدوير ABI Prism7500 (غالباً زر التشغيل أقصى اليمين)
٤. يضغط زر فتح الباب (الزر الثاني من اليمين لونه رمادي غامق وهو منخفض)
٥. توضع أنابيب التفاعل في الصينية السوداء. تتم موازنة الأنابيب في الصينية وبذلك فإن الغطاء الساخن الذي سيغطي العينات لن يستند على جهاز التدوير الحراري. يضغط على الزر الرمادي المنخفض مع دفع الباب للأمام حتى يغلق، ولن يغلق الباب عند الضغط على أي مكان آخر.

- **التشغيل**

١. يشغل الحاسوب
٢. فتح برنامج التشغيل 7500 System SDS بالضغط على اختصاره على سطح المكتب
٣. اختيار ملف/ جديد
٤. تظهر قائمة بعدة خيارات:

a) التقييم. اختيار التقييم النسبي أو غير النسبي. تجدر الإشارة هنا إلى أن البيانات المتحصل عليها من أحد هذه التقييمات لا يفيد مع الآخر. نختار التقييم غير النسبي أو المطلق إذا كان الهدف هو الحصول على منحنى قياسي. اختر طبق نسبي relative plate وليس دراسة نسبية relative study، تستخدم الدراسة النسبية لتحليل عدة أطباق.

b) الحاوية container: يوجد خيار واحد في الجهاز ٧٥٠٠ ABI Prism وهو أطباق سعة ٩٦ بئراً

c) القالب Template. فارغ blank. يمكن أن تختار template إذا كنت قد قمت بإنشائه لتجربتك بشكل مسبق.

d) المشغل operator: يمكن أن تضع اسمك إذا أردت.

e) التعليقات: يمكن أن تضع أية معلومات ترغب بها خاصة بهذا الاختبار.

f) اسم الطبق: سمِ الطبق بحيث يمكن أن تجده لاحقاً.

٥. اختر التالي

٦. اختر الكواشف detectors لإضافتها إلى مستند الطبق plate document. الكواشف هي تلك التي وسمت بها المسابر التي تستخدمها. يعني اختيار الكواشف بأنها ستظهر عند فتح مراقب الآبار well inspector، هناك زر في واجهة تطبيق مراقب الآبار يمكن استخدامه أيضاً لإضافة الكواشف إذا نسيت إضافتها في هذه المرحلة.

a) قم بتفعيل الكاشف الذي تحتاجه

b) انظر في الأسفل من أجل التعليمات الخاصة بإضافة كاشف جديد لقائمتك

c) اضغط على إضافة

d) إنهاء finish، وليس التالي next. من السهل تسمية كل بئر عند العرض على كامل الشاشة والذي نحصل عليه عند الضغط على زر الإنهاء.

٧. يعتمد إنشاء مستند الطبق على إعداد حقول الجدول والطبق المختار. لايمكن تخزين الطبق بدون تسمية العينات إما باستخدام مراقب الآبار أو الكتابة مباشرة في البئر.

٨. حدد الكاشف ومهمته في كل بئر:

a) افتح مراقب الآبار well inspector؛ التعليمة Veiw/Well inspector؛ CTRL 1 أو استخدم زر مراقب الآبار (مربع عليه رمز مكبرة).

b) انقر على البئر أو اسحب الدالة على رقم البئر.

c) تفقد الحقول بأنه تم اختيار الكاشف للآبار المختارة (يأتي هذا من الكواشف التي تم اختيارها في الخطوة رقم ٦) يمكن اختيار أكثر من كاشف إذا كان ذلك قابل للتطبيق. يظهر لونان في البئر.

d) انقر تحت عمود المهام لتحديد مهمة الكاشف. اختيار Unknown لغير الموجود

e) قياسي standard. إذا أردنا عمل مؤشر قياسي نختار قياسي STD من عمود المهام. هنا يجب أن نكتب في عمود الكمية. لا يمكن تدوين ملاحظات علمية. لا تستخدم واحدات حتى لو كانت نسبية، مثلاً في بئر ١ وفي التالي ٠.٠١ والذي بعده ٠.٠٠٠١.

f) يمكنك تسمية العينات. يمكن تحديد مجموعة من الآبار وكتابة اسم فيها تحت بند اسم العينة وعنده سيظهر الاسم في كل واحد منها. إذا أردت أن تضع واحدات أو تفاصيل أكثر للعينات القياسية يمكن أن تفعل ذلك هنا. أيضاً يمكن النقر على حقل البئر وكتابة الاسم دون الذهاب إلى تعليمة مراقب الآبار.

٩. إذا نسيت أحد الكواشف، اختر إضافة كاشف، حدد الكاشف الذي تريده. أضفه إلى مستند الطبق. انقر على الزر تم done.

١٠. أغلق نافذة مراقب العينات عند تسمية كل العينات.

١١. تأكد من صحة تسمية العينات والكواشف. يمكن التغيير بالعودة إلى مراقب الآبار.

١٢. اختر زر أداة instrument. يمكنك تغيير أي من المتغيرات تبعاً لحاجتك وذلك بتحديد ماتريد تغييره ثم اكتب فيه.

a) لحذف خطوة، انقر نقرة مزدوجة على تلك الخطوة أو انقر بالدالة واسحب نحو تلك الخطوة. ثم حذف

b) إضافة مرحلة بتحريك العمود الأسود الغليظ إلى يمين الخطوة لتضيف بعدها (انقر بالفارة على الخط لتحريكه). اختر إضافة دورة (كرر خطوة المراحل إلى يمين الخط الأسود) أو خطوة (أضف خطوة واحدة للمرحلة)

c) تغيير حجم العينة إلى الحجم المستخدم في التفاعل

d) تفقد محاكاة ٩٦٠٠. يبطئ معدل الانحدار

e) أضف مرحلة الفصل dissociation إذا كنت تستخدم طريقة SYBR Green.

f) إعداد جمع البيانات يكون في مرحلة نهاية التفاعل. يمكن تحديد مرحلة أخرى لجمع البيانات.لكن في الجهاز ٧٥٠٠ يمكنك اختيار مرحلة واحدة.

١٣. ملف / حفظ باسم save as / السواقة D. قم بإنشاء مجلد باسم المخبر / اسم الملف (عادة يستخدم اسم وتاريخ)/ تخزين save. تتلقى رسالة خطأ عند الضغط على زر البدء دون تخزين الملف.

١٤. ضع الطبق (أو الأنابيب) في الجهاز. تقع العينة A1 في الزاوية العليا اليسرى. تأكد من وضع المسند الأسود فوق الفتحات. تأكد من أن غطاء الطبق أو الأنابيب مستوية. توازن الطبق على الحامل، توضع بعض الأنابيب الفارغة في موقع معينة بحيث تؤمن توازن للغطاء الساخن عند نزوله فوق العينات. تأكد أن توزيع العينات على الطبق مشابه لطريقة الإعداد على المستند.

١٥. اضغط على زر البداية start. لا تغادر المكان قبل التأكد من بدء العمل بشكل صحيح وظهور الأرقام في الماكن المختلفة. قد يعلق الغطاء الساخن أحياناً على أغطية الأنابيب ويتوقف عندها الجهاز عن العمل. عند إلقاء حتى التأكد من ظهور تلك الأرقام عنده نتأكد من تجاوز مشكلة التوقف. لا تغلق البرنامج أثناء التشغيل. يمكن استخدام الكومبيوتر لأغراض أخرى أثناء التشغيل. يمكن النظر لرؤية النتيجة بعد ٦ دورات، ما تراه هو ناتج ما حدث منذ عدة دورات سابقة.

١٦. إذا تلقيت رسلة خطأ وأردت وأردت أن تصلح الغطاء الساخن. زر بداية التشغيل يكون غير مفعل. لإصلاح الغطاء العالق. يجب إغلاق البرنامج وإعادة فتحه. في هذه الحالة لن تفقد أي شي لأك خزنت المعلومات الخاصة بالطبق.

- **التحليل Analysis**

١. بعد انتهاء التفاعل، اضغط على السهم الأخضر أو اذهب إلى تحليل analysis اختر حلل analyze.

٢. اختر القائمة الفرعية نتائج results، لرؤية النتائج يجب تحديد الآبار التي تريد رؤية نتائجها بسحب الدالة فوقها أو يمكن تحديد كل الآبار بالضغط على الزر الموجود في الزاوية أقصى اليسار (بين الرقم ١ والحرف A).

٣. القائمة الفرعية نتائج Results tab:

a) القائمة تحت الفرعية طبق plate tab. يعرض بيانات النتائج لكل بئر بما فيه سمّ العينة والكاشف وقيمة Rn.

b) القائمة تحت الفرعية طيف spectra. يعرض فيه طيف التوهج للآبار المحددة. يمكن رؤية الطيف لكل واحدة من الدورات بسحب أو انزلاق الزر الموجود في الأسفل. نستدل على الوضع الحالي للزلاقة من الرقم في مربع النص الذي يعطي رقم الدورة.

c) القائمة الفرعية مكونات component tab. يعرض المساهمة الكاملة في الطيف لكل صباغ في البئر المحدد خلال جريان التفاعل.

d) القائمة الفرعية الرسم البياني للتضاعف Amplification plot tab. يعرض الرسم البياني لتعادل الدال Rn كدالة لرقم الدورة من أجل كاشف وآبار محددة.

e) المنحنى القياسي standard curve. إذا قمت بالإعداد بشكل صحيح عندها يمكن رؤية المنحنى. إذا لم تلاحظ شيئاً، هل قمت بتحديد الآبار؟ هل قمت بتسمية الطبق بشكل صحيح (توضع تسمية قياسي standard في الآبار مع إدخال الكميات؟ إذا لم تكن التسمية صحيحة عندها يمكن أن تعود لإضافتهم، لكن تحتاج في هذه الحالة إلى إعادة عملية التحليل.

f) الانفصال Dissociation. يستخدم فقط مع الكاشف SYBR Green.

g) أرقام دورة البداية الفعلية C_T تظهر في صفحة اكسل. هذ الصفحة ليست تماماً صفحة اكسل إنما يجب أن تصدر النتائج إلى ملف اكسل وتقوم بمعلجة النتائج عليها (يناقش لاحقاً تفسير النتائج).

٤. ضبط محور X أو Y. يتم بالنقر على المحور الذي تريد تغييره.

٥.

- **فتح البيانات في صفحة اكسل**

١. عند الانتهاء من التفاعل وتحليل البيانات، قم بنقل البيانات إلى صفحة اكسل بالتعليمة: File/Export/results.

٢. تفتح نافذة تصدير الملف باسم الملف الذي قمت بتخزينه سابقاً عند إنشاء مستند الطبق. اختر save. لا تنقل الملف إلى أي مكان آخر ولا تقم بتغيير اسمه.

٣. مستندات البدء start documents. عند قيامك بالتخزين سيكون لديك ملفان؛ الأول على شكل مستند امتداده SDS (ملف تشغيل البرنامج أو مستند الطبق) والثاني سيظهر على شكل أيقونة ملف اكسل بجانبها اسم الملف. قم باختيار ملف الاكسل حيث ستظهر البيانات فيه.

- **تحليل البيانات وتفسير النتائج Data analysis and interpretation of results**

تحلل النتائج بعد إنتهاء التفاعل باستخدام جهاز التدوير الحراري بالوقت الحقيقي ABI PRISM® 7500 SDS للحصول على قيم دورة البداية C_T لكل صباغ دال reporter dye ولكل عينة. يتم التأكد بدقة من عدد العينات على الطبق المصمم على برنامج الحاسوب SDS، حيث يأخذ كل بئر رقم وحيد في حقل المكررات، مكررات العينة الواحدة تعطى نفس الرقم.

تحلل النتائج باختيار التعليمة "analyse" من قائمة التحاليل Analysis menu حيث تفعل نافذة التضاعف بشكل آلي. تضبط قيمة دورة البداية لكل من **الصباغين** FAM و VIC.

بعد تحليل النتائج انقل البيانات بالضغط على تعليمة export إلى صفحة اكسل Microsoft®Excel، حيث تظهر النتائج في مجموعتين توافقان **الصباغين** المستخدمين في الكشف FAM و VIC مع قيمة دورة البداية C_T لكل بئر.

احسب متوسط قيمة C_T لكل مجموعة من المكررات للحصول عليى قيم ΔC_T (C_TFAM—C_TVIC).

تحسب قيمة النسبة المئوية للتعديل الوراثي %GMO بتحليل قيم ΔC_T للعينات، ثم مقارنتها مع لوغاريتم %GMO وقيم ΔC_T لتراكيز العينات القياسية.

٢ . ٤ . ٨. طريقة التحديد الكمي المتخصص بسلالة الذرة المعدلة وراثياً TC1507 بوساطة التفاعل السلسلي البوليميرازي "بي سي أر" بالزمن الحقيقي
Quantification of maize TC1507 by Uniplex Real-Time PCR

المبدأ. تحدد هذه الطريقة المحتوى النسبي من كمية الدنا المعدل وراثياً في سلالة الذرة المعدلة وراثياً (TC1507) نسبة إلى الـ دنا الكلي للذرة في العينة. للكشف المتخصص للـ دنا الجينومي للسلالة TC1507، يتم تضخيم جزء ممتد في منطقة اتصال مركب الـ دنا المأشوب مع جينوم النبات بحجم ٥٨ شفع نيوكليوتيدي من منطقة البلاسميد المركب الذي تم إدخاله في جينوم النبات باستخدام زوجين متخصصين من البادئات. يستخدم مورثة مرجعية خاصة بالذرة بحجم ٧٩ شفع نيوكليوتيدي من مورثة المجموعة عالية التنقل وهي مورثة خاصة مميزة بالذرة، وذلك باستخدام زوجين من البادئات الخاصة بهذه المورثة ومسبار خاص بالمورثة نفسها معلم بالصبغات فام و تامارا .

يجب فحص الـ دنا المستخلص حسب الطرائق المناسبة وذلك من حيث النوعية والكمية قبل الاستخدام في اختبار ا لـ بي سي أر. ويجب إجراء اختبارات من حيث وجود مثبطات تفاعل ا لـ بي سي أر (مثال: إجراء تفاعل استكشافي، استخدام تراكيز متتالية /مختلفة من الـ دنا).

يتم قياس منتجات ا لـ بي سي ار أثناء كل دورة بالزمن الحقيقي عن طريق مسبار نيوكليوتيدي نوعي خاص بالهدف ومعلم بصبغتان متوهجتان هما: فام FAM كصبغة مخبرة عند نهايتها الطرفية ٥ و تامارا TAMARA كصبغة قابضة عند النهاية ٣.

من أجل تحديد نسبة الدنا المعدل في السلالة TC1507، يستخدم مورثة مرجعية خاصة بالذرة بحجم ٧٩ شفع نيوكليوتيدي من مورثة المجموعة عالية التنقل وهي مورثة خاصة مميزة بالذرة، وذلك باستخدام زوجين من البادئات الخاصة بهذه المورثة ومسبار خاص بالمورثة نفسها معلم بالصبغات فام و تامارا كما هو موصوف أعلاه.

تتجاوز شارة التوهج المقاسة قيمة العتبة الدنيا بعد عدد محدد من الدورات. دورة العتبة هذه تدعى قيمة **Ct**. لتحديد كمية الدنا المعدل بالسلالة المعدلة وراثيا TC1507 في العينة لمختبرة، يلزم تحديد قيم الـ **Ct** لكل من مورثة المجموعة عالية التنقل والسلالة TC1507. عندئذ تستخدم المنحنيات لقياسية لحساب المحتوى النسبي لدنا السلالة TC1507 مقارنة بـ دنا الذرة الكلي.

المـــــــواد

الأدوات

- جهاز بي سي أر بالزمن الحقيقي لأوعية تفاعل بلاستيكية (لا ينصح باستخدام الأنابيب الشعرية الزجاجية لتركيب المحلول المنظم الموصوف هنا).
- أوعية تفاعل بلاستيكية مناسبة لجهاز ا لبي سي أر والتي تمكن من كشف التوهج بدون عائق)
- برنامج لتقييم البيانات بناء على طريقة المنحنى القياسي (غالبا مدمجة في برنامج جهاز ا لـ بي سي ار بالزمن الحقيقي).
- أنابيب تثفيل ميكروسنتريفيوج
- ماصات قياسية دقيقة
- مازج فورتكس
- حامل لأنابيب التفاعل
- أنابيب تثفيل سعة 1.5 مل/ 2 مل

المواد الكيمياوية

TRIS pH=8.0: Tris[hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride (Molecular Biology grade)
KOAc (SIGMA Part No P1190)
Gelatine (VWR Part No 1.04078.1000)
Tween 20 (SIGMA Part No P9416-50ML)
Glycerol (SIGMA Part No P5516-100ML)
Rox (Applied Biosystems Part No 434925)
dATP (GeneCraft Part No GC-013-007)
dCTP (GeneCraft Part No GC-013-009)
dGTP (GeneCraft Part No GC-013-006)
dUTP (GeneCraft Part No GC-013-010)
MgCl 2 (SIGMA Part No M1028-1ML)
Ampli Taq Gold (Applied Biosystems Part No N8080242)

البادئات والمسابر

	Name اسم البادئ/المسبار	Oligonucleotide DNA Sequence (5' to 3') تسلسل نيوكلوتيدات ال دنا
	TC1507 target sequence تسلسل المورثة الهدف	
Primers البادئات	MaiY-F1 MaiY-R3	TAG TCT TCG GCC AGA ATG G CTT TGC CAA GAT CAA GCG
Probe المسبار	MaiY-S1	6-FAM-TAA CTC AAG GCC CTC ACT CCG-TAMRA
	Reference gene HMG target sequence تسلسل المورثة المرجعية ، مورثة تامجموعة عالية التنقل	
Primers البادئ	MaiJ-F2 mhmg-rev	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
Probe المسبار	Mhmg-probe	6-FAM-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-TAMRA

المحاليل المنظمة والمحاليل الأخرى

يبين الآتي وصف المحاليل المنظمة المستخدمة في هذا البروتوكول. يمكن استخدام مواد معادلة لها.

تحضير محلول منظم X10

امزج المواد الكيماوية الآتية حسب التركيز النهائي المبين وعدل حموضة المحلول إلى ٨.

Component المكونات	Final concentrationالتركيز النهائي
Tris pH = 8.0	0.5 M
KOAc	0.5 M
Gelatine	0.5%
Tween 20	0.1%
Glycerol	0.8%
Rox	0.2 µl/reaction
Water	-

عموميات. يجب تحضير مكونات تفاعل ا لـ بي سي أر لتسلسل المورثة الخاصة بالنوع (مورثة المجموعة عالية التنقل) والتسلسل المستهدف للذرة المعدلة وراثيا TC1507 في أنبوبين منفصلين كل على حدا. لم يتم اختبار أو اثبات تفاعل بي سي أر ثنائي (باستخدام معلمات متوهجة تفاضلياً للمسابر).

ينصح باستخدام ٢٠٠ نانوغرام كأقصى حد من الـ دنا القالب بكل بئر تفاعل.

الطريقة مطورة لحجم كلي ٢٥ ميكروليتر لكل مزيج تفاعل من مواد التفاعل حسب ما هو مبين في الجدولين ٢٥ و٢٦ .

المنحنى القياسي / المعايرة: يتم عمل منحنيات معايرة منفصلة لكل بادئ/مسبار في نفس تفاعل التضخيم التحليلي.

تتألف منحنيات المعايرة من ٤ مخففات من عينة الـ دنا المحتوي على ١٠% TC1507. يمكن استخدام سلسلة من ١ إلى ٥ مخففات بفواصل بدءاً من تركيز الذرة ٧٣.٣٩٤ نسخة من الجينوم (وهذا ما يعادل ٢.٧٢٥ بيكوغرام من دنا الذرة الجينومي أحادي الصيغة الصبغية (Arumuganathan & Earle 1991).

يتم إنتاج (عمل) منحنى معايرة بأخذ قيم الـ Ct مقابل لوغاريتم عدد نسخ الهدف لنقاط المعايرة. هذا يمكن عمله مثلا باستخدام برنامج صفحة منتشرة spreadsheet مثل برنامج اكسل أو مباشرة حسب الخيارات المتاحة ببرنامج نظام كشف التسلسل.

يتم الحصول على عدد نسخ دنا العينة المجهولة من خلال المقارنة والاستنتاج من المنحنيات القياسية.

الطريقة

١- ذوب، امزج بلطف وثفل الكمية التي تحتاجها من المكونات المطلوبة للتفاعل. احتفظ بالمواد التي تم تذويبها بدرجة ١-٤ م على الثلج.

٢- في أنبوبي تفاعل (واحد للذرة المعدلة TC1507 والثانية للمورثة عالية التنقل) على الثلج، أضف المكونات التالية (جدول ٢٥ و٢٦) حسب الترتيب المذكور (ما عدا الـ دنا) لتحضير المزائج الأساسية.

٣- امزج بلطف وثفل لفترة وجيزة.

٤- حضر أنبوبي تثفيل ميكروفيوج (أنبوب لعينة TC1507 وأنبوب للمورثة المرجعية عالية التنقل من الذرة) لكل عينة دنا مراد اختباره (عينات المنحنى القياسي و العينات المجهولة وعينات الشاهد) .

٥- أضف إلى كل أنبوب الكمية المحددة من المزيج الأم (مثلا ٢٠ X ٣ = ٦٠ µl من المزيج الأساسي والضرورية لـ ٣ مكررات). أضف لكل أنبوب الكمية المطلوبة من الـ دنا لـ ٣ مكررات (مثلا٥ X٣ = ١٥ دنا). امزج بالفورتكس على سرعة منخفضة كل أنبوب على الأقل ٣ مرات لمدة حوالي ٣٠ ثانية. هذه الخطوة اجبارية ، لأنها تساعد في التقليل من التباين بين المكررات لكل عينة.

٦- تثفيل بالميكروسنتريفيوج. وزع في كل بئر µl 25 . غط طبق التفاعل بغطاء شفاف. ثفل الطبق على سرعة منخفضة (مثلاً ٢٥٠g لمدة ١ دقيقة بدرجة ٤ م إلى درجة حرارة الغرفة) لتثفيل مزيج التفاعل.

٧- ضع الطبق في الجهاز

٨- شغل جهاز ا لـ بي سي أر بالزمن الحقيقي حسب برنامج الدورات الموصوفة في الجدول ٢٧ أدناه.

جدول ٢٥. مزيج تفاعل التضخيم في الحجم/ التركيز النهائي بكل بئر تفاعل لنظام خاص بالذرة المعدلة وراثيا TC1507

المكونات	التركيز النهائي	ميكرولترµl /تفاعل
Buffer 10x (including Rox)	1x	2.5 µl
Primer MaiJ-F1	300 nM	-
Primer MaiY-R3	300 nM	-
Probe MaiY-S1	150 nM	-
MgCl2[a] 25 mM	5.5 mM	5.5 µl
dNTPs[a] 10/20 mM	200/400 µM	0.5 µl
AmpliTaq Gold Polymerase	1U/reaction	-
Nuclease free water		حتى25 µl
[Template DNA (maximum 200 ng, see 3.4.1 and 3.4.2)]		(5 µl)
Total reaction volume: حجم التفاعل الكلي25 µl		

[a]dATP (10 mM), dCTP (10 mM), dGTP (10 mM), dUTP (20 mM)

جدول ٢٦. مزيج تفاعل التضخيم في تفاعل ا لـ بي سي أر خاص بمورثة المجموعة عالية التنقل في الذرة

المكونات	التركيز النهائي	ميكرولتر µl /تفاعل
Buffer 10x (including Rox)	1x	2.5 µl
Primer MaiJ-F1	300 nM	-
Primer mhmg-rev	300 nM	-
Probe mhmg	180 nM	-
MgCl2 25 mM	4.5 mM	4.5 µl
dNTPs[a] 10/20 mM	200/400 µM	0.5 µl
AmpliTaq Gold Polymerase	1U/reaction	-
Nuclease free water		حتى25 µl
[Template DNA (maximum 200 ng, see 3.4.1 and 3.4.2)]		(5 µl)
Total reaction volume: حجم التفاعل الكلي 25 µl		

[a]dATP (10 mM), dCTP (10 mM), dGTP (10 mM), dUTP (20 mM)

جدول ٢٧. ظروف تفاعل ا لـ بي سي أر بالزمن الحقيقي

Cycle **المرحلة**	Step **الخطوة**		Temp. (ºC) درجة الحرارة	Time (sec) المدة	Data Collection جمع البيانات	Repetitions الدورات
1	Initial Denaturation الفك الأولي		95	600	No لا	1
2	Amplification التضخيم	Denaturation فك سلاسل الـ دنا	95	15	No لا	1
		Annealing & Extension الارتباط واكمال سلسلة الدنا	60	60	Yes أجر القياس	45

تحليل البيانات

بعد انتهاء التفاعل، حلل بإتباع الإجراءات الآتية:

أ- إعداد العتبة Set the threshold:

- اعرض منحنيات التضخيم للنظام الأول (مثلاً TC1507) بطريقة لوغاريتمية.
- حدد خط العتبة في المنطقة التي تكون فيها منحنيات التضخيم متوازية (المرحلة الأسية في تفاعل ا لـ بي سي أر) وحيث لا يوجد ما يسمى "تأثير نقاط التقاطع" بين مكررات نفس العينة.
- اضغط زر التحديث لتضمن التغييرات المؤثرة في قيم دورة البداية الفعلية CT.
- تحول الى طريقة الرؤيا الخطية بكبس زر محور العينات لمنحنى التضخيم
- اختبر ما اذا العتبة المحددة سابقا تقع ضمن الطور الهندسي للمنحنيات.

ب. حدد الخط الأساس Set the baseline وهو عبارة عن الدورات الابتدائية للـ PCR التي يحدث فيها تغيرات طفيفة في إشارة التوهج.

- حدد رقم الدورة التي يجتاز فيها خط العتبة أول منحنى تضخيم
- حدد الخط الأساس قبل٣ دورات من تلك القيمة (مثلاً أول دورة فعلية CT هي٢٥، عندئذ
- حدد خط الأساس يقطع الـ CT عند ٢٥-٣= ٢٢).

ت- احفظ هذه التحديدات.

ث- أعد الإجراء الموصوف في الفقرة ١ و ٢ على منحنيات تضخيم المجموعة الأخرى المختبرة (مثلاً مورثة المجموعة عالية التنقل).

ج- احفظ هذه التحديدات وانقل كل البيانات إلى ملف اكسل لإجراء حسابات أخرى.

حساب النتائج: بعد تحديد قيمة العتبة ضمن الطور اللوغاريتمي للتضخيم حسب ما هو موصوف أعلاه، فان برنامج الجهاز يحسب قيم الـ Ct لكل تفاعل. ترسم المنحنيات القياسية لكل من مورثة المجموعة عالية التنقل ولـ TC1507 بالرسم البياني بوضع قيم الـ Ct المقاسة لنقاط المعايرة مقابل لوغاريتم عدد نسخ الـ دنا وادماج مستوى الانحدار الخطي الى هذه البيانات.

بعد ذلك، تستخدم المنحنيات القياسية لتقدير عدد النسخ في دنا العينة المجهولة من خلال المنحنيات القياسية.

لتحديد كمية الـ الدنا في الـ TC1507 في العينة المجهولة، يقسم عدد نسخ الـ TC1507 على عدد نسخ المورثة المرجعية عالية التنقل وتضرب بـ ١٠٠ للحصول على النسبة المئوية (النسبة المئوية للتعديل الوراثي= TC1507/ المورثة المرجعية عالية التنقل ١٠٠X).

حدود الكشف. حسب مطور الطريقة، الحدود الدنيا المطلقة للكشف بالطريقة هي ١.٢٥ نسخة (٨ موجب من أصل ١٠ مكررات). لم تقدر الحدود الدنيا النسبية في التجربة المشتركة هذه. أدنى تركيز نسبي لتسلسل نيوكليوتيدات الـ دنا المستهدف المشتمل في التجربة المشتركة هو ٠.١ %.

حدود التحديد الكمي. حسب مطور الطريقة، فان الحدود الدنيا للنسب الكمية بالطريقة هي أقل أو تساوي ٠.٠٨% . الحدود المطلقة للنسب الكمية بكل طريقة على حدا هي أقل أو تساوي ١٠ نسخ من TC1507 وأقل أو تساوي ٤٠ نسخة من مورثة المجموعة عالية التنقل. أدنى تركيز نسبي للتسلسل المستهدف المشتمل في التجربة المشتركة هو ٠.١%.

تعليمات واحتياطات عامة.

- يجب أن يتم تداول كل المواد الكيماوية والكواشف والشاهد في الظروف المحددة حسب مقاييس الايزو ISO 9001:2000 أو ISO 17025 أو ما يماثلها.
- تتطلب الإجراءات خبرة في العمل تحت شروط معقمة.
- تنظيم المخبر، مثل اتجاه انسياب الهواء أثناء تحضير مكونات تفاعل ا لـ بي سي أر والذي يجب أن يتم حسب الشروط والتعليمات المحددة من قبل الجهات المعنية مثل ايزو، CEN، Codex alimentarius Commission اللجنة الدولية لمستويات /مواصفات الغذاء

- يجب أن تخزن مكونات تفاعل ا لـ بي سي أر ويتم تداولها في غرفة خاصة وتجمد وفي جهاز حيث لم تستخدم قبل ذلك أي حموض نووية (باستثناء بادئات ا لـ بي سي أر أو مسابر) أو أنزيمات محطمة/ مفككة أو معدلة للـ دنا. تتطلب كل تداولات مكونات ا لـ بي سي أر والشاهد أدوات خاصة لذلك، وخاصة الماصات.
- يجب أن تعقم كل الأجهزة قبل الاستخدام، يجب إزالة أي بقايا للـ دنا. كل المواد المستخدمة (مثل الأنابيب، الأوعية، رؤوس الماصات وغيرها) يجب أن تكون مناسبة لتطبيقات ا لـ بي سي أر والبيولوجيا الجزيئية. يجب أن تكون خالية من الأنزيمات المفككة للـ دنا وخالية من الـ دنا ومعقمة ويجب ألا تمتص بروتين أو دنا.
- لتجنب التلوث، ينبغي استخدام رؤوس ماصات مزودة بفلتر حماية لمنع بخار الايروسول.
- استخدم فقط كفوف بلاستيكية خالية من البودرة وبدلها بشكل متكرر.
- نظف سطوح طاولات المخبر والأجهزة بشكل دوري بهيبو كلوريت الصوديوم تركيز ١٠%.
- يجب فحص الماصات دورياً من حيث الدقة والمعايرة عند الضرورة.
- كل خطوات العمل – ما لم يذكر خلاف ذلك- يجب أن تتم بدرجة ٠-٤ م.
- لتجنب مرات التذويب والتجميد، يجب تحضير كميات صغيرة موزعة في أنابيب تستخدم لمرة واحدة.

http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.html

المراجع

المراجع العربية

- معجم مصطلحات التقنية الحيوية في مجال الأغذية والزراعة. إعداد عبد الوهاب زايد، هـ. ج. هيوز، أ. بورسيدو، ف. نيكولاس إصدارات منظمة الأغذية والزراعة في مجال البحوث والتقنية. مطبوعات جامعة الإمارات العربية المتحدة، ٢٠٠٦. ٤٣٢ صفحة

المراجع الأجنبية

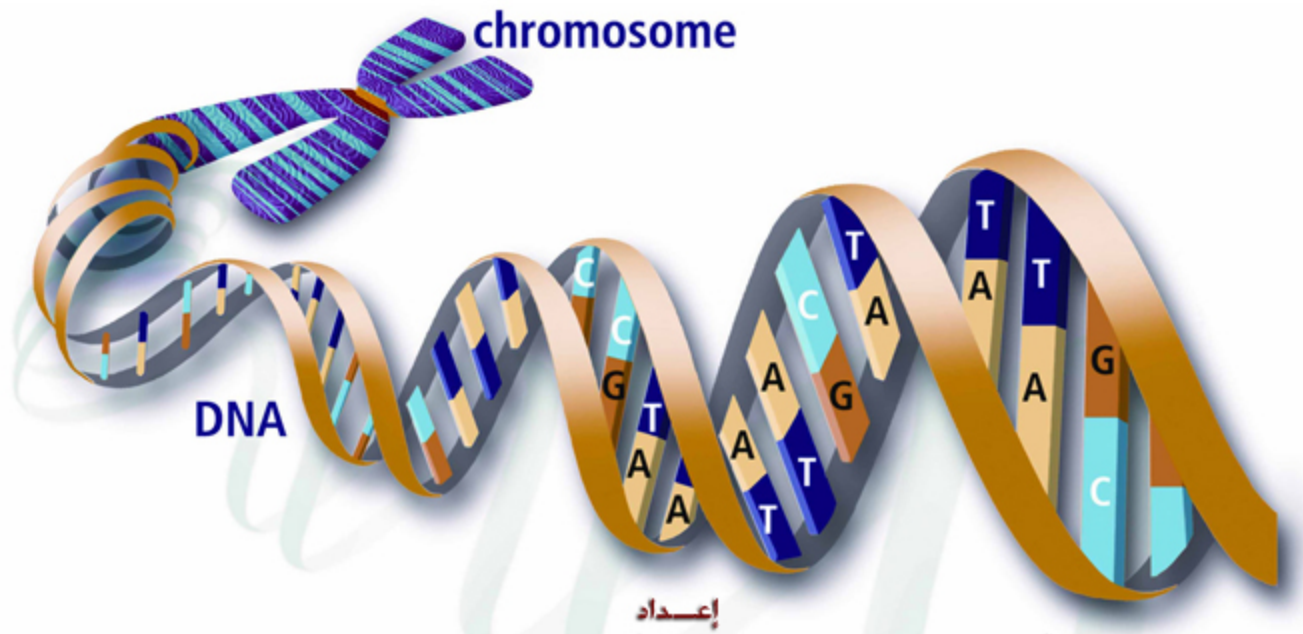
المراجع الأجنبية المستخدمة معروضة في القسم الانكليزي من هذا الدليل

الدليـــــل النظـــري والعـمـلـي
للدورة التدريبية الإقليمية حول

"الكشف عن المواد المعدلة وراثياً والأمان الحيوي في الأغذية والزراعة"

ايكاردا- حلب- ســـــوريا

19-24 حزيران 2010



إعـــداد

د. أحمـد عـبـد القـادر - د. غـريتـا أبو سليمان - د. فاتـح الخطـيب
جويس صقر - د. مايـــكل بـاوم

ترجمـــة

د. أحمـد عـبـد القـادر – د. فاتح الخطيب- د. نبيل الأحمـد بـك – د. حسـين الزعـبي

الجهات المنظمة للدورة

الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)
منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (فاو)

مشروع فـــــاو الإقليمي TCP/RAB/3202

"تعزيز القدرات نحو تأسيس قاعدة إقليمية للكشف عن الكائنات الحية المعدلة وراثياً"

الهيئة العامة للبحوث العلميـــة الزراعيـــة
المركـــز الدولـــي للبحـــوث الزراعيـــة في المناطـــق الجافـــة (ايكاردا)
منظمة الأغذيـة والزراعة للأمم المتحـدة (فاو)