**دانشگاه گیلان**

**دانشکده علوم کشاورزی**

**پایان نامه کارشناسی ارشد**

# آنالیز پنبه‌های تراریخته با استفاده از الکتروفورز دو بعدی

**از**

**آرمینه حیدریان**

**اساتید راهنما**

**دکتر سید حسن حسنی**

**و**

**دکتر مسعود توحید فر**

**اسفند ۱۳۹۱**

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

(بیوتکنولوژی کشاورزی)

عنوان:

# آنالیز پنبه‌های تراریخته با استفاده از الکتروفورز دو بعدی

از:

**آرمینه حیدریان**

اساتید راهنما:

**دکتر سید حسن حسنی و دکتر مسعود توحید فر**

**استاد مشاور:**

**دکتر قاسم حسینی سالکده**

اسفند ماه ۱۳۹۱

تقدیم به

پدر عزیزم و مادر مهربانم

که طپش قلبم به موجب وجود آنهاست

به

خواهر و برادر مهربانم

که به زندگیم امید می‌بخشند

الهی:

ادای شکر تو هیچ حد زمان نیست. دریای فضل تو را هیچ کران نیست و سر حقیقت تو بر هیچ کس عیان نیست. هدایت کن ما را به راهی که بهتر از آن نیست.

اکنون که به لطف خداوند، توفیق یافته ام تا رساله خویش را به اتمام رسانم، بر خود لازم می دانم از تمامی اساتید و دوستانی که به نحوی در طول انجام این تحقیق حقیر را یاری نموده اند تشکر و سپاسگزاری نمایم.

در ابتدا از پدر و مادرم، معلم های همیشگی زندگیم که مشوق اصلی من در این راه بودند و همواره وجودشان موجب دلگرمیم می باشد صمیمانه سپاسگزارم و امیدوارم بتوانم سپاسگزار زحماتشان باشم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر حسنی که به عنوان استاد راهنمای این رساله در طول مدت انجام تحیق با اینجانب همراه بود و از بذل هیچ توجهی دریغ نفرمودند کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

حضور در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی آرزویی بود که با افتخار شاگردی در محضر استاد ارجمند جناب آقای دکتر توحیدفر که در تمامی طول مدت انجام تحقیق از هیچ راهنمایی علمی ارزنده و دلگرمی دریغ نفرمودند و اینجانب را مورد لطف بی اندازه خود قرار دادند، محقق شد.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر حسینی سالکده که مشاور من در انجام این تحقیق بودند و نظریات و تجربیات ارزشمندشان همواره راه گشای این تحقیق بود، بی نهایت سپاسگزارم. بی شک این تحقیق میسر نمی شد مگر با مساعدت و راهنمایی های علمی این استاد ارجمند.

همچنین در طی مراحل اجرای این تحقیق از همکاری و مساعدت اعضا محترم بخش کشت بافت و انتقال ژن، فیزیولوژی، ژنومیکس و پروتئومیکس پژوهشکده تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی برخوردار شدم که بدین وسیله از همگی آنها قدردانی می کنم. بویژه سرکار خانم مهندس سرحدی که همانند خواهری دلسوز صمیمانه من را در انجام این تحقیق یاری کردند و از همکاری ها و تجربیات ایشان بهره مند شدم، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

ازمدیریت محترم دانشگاه گیلان و هم چنین مدیر گروه بیوتکنولوژی و اساتید گروه که در طول مدت تحصیل از اطلاعات و تجربیات علمی شان مستفید شدم کمال تشکر را دارم.

هم چنین از مدیریت محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی که با ایجاد محیطی آرام و دوستانه و کاملاً علمی همراه ما در انجام این تحقیق بودند صمیمانه قدردانی می کنم.

در این دو سال دوستان با ارزشی به گنجینه سرمایه های من افزوده شدند، دوستان و همکلاسی های عزیزم در دانشگاه گیلان خانم ها و آقایان

بهناز زادفر، سارا طالبی، ژاله حکمتی، ، مینا خوشبخت، حمیده کاروانکش، حمیده طاهری، هما ایزد دوست، فاطمه حسنی، طاهره فتحی، تقی مؤذن زاده، محسن ایمان زاده، یونس میرزایی، علی مبارکی، یعقوب احمد یوسفی

و در پژوهشکده بیوتکنولوژی خانم ها و آقایان

الهام سرحدی، الهام فغانی، مریم افتخاری، سولماز عظیمی، علی رضا ستارزاده، محمد جهانبخش پور، بهرام مسعودی

و

سایر دوستان که برایشان بهترین ها را آرزومندم.

در پایان از خواهر و برادرم که همواره مشوق و حامی من در طول دوران تحصیلم بودند صمیمانه تشکر می کنم و به امید روزی که بتوانم ذره ای از محبتشان را پاسخگو باشم.

آرمینه حیدریان

اسفندماه هزار و سیصد و نود و یک

**فهرست مطالب**

فهرست جداول..... ح

فهرست اشکال..... د

چکیده فارسی..... ذ

چکیده انگلیسی..... ر

مقدمه..... ۱

## فصل اول

کلیات و بررسی منابع..... ۴

۱-۱- پنبه..... ۵

۱-۱-۱- تولید پنبه..... ۵

۱-۱-۲- گیاه شناسی پنبه..... ۶

۱-۱-۳- سازگاری و نیازهای آب و هوایی..... ۶

۱-۱-۴- آفات و بیماری‌های پنبه..... ۷

۱-۱-۴-۱- کرم قوزه پنبه..... ۷

۱-۱-۴-۲- بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه..... ۸

۱-۱-۵- پنبه‌های تراریخته..... ۹

۱-۲- گیاهان تراریخته..... ۹

۱-۲-۱- اهمیت استفاده از گیاهان تراریخته ..... ۹
۱-۲-۲- تاریخچه گیاهان تراریخته ..... ۱۰
۱-۲-۳- مزایای استفاده از گیاهان تراریخته ..... ۱۱
۱-۳- پروتئومیکس ..... ۱۲
۱-۳-۱- تعریف پروتئومیکس ..... ۱۳
۱-۳-۲- اهمیت پروتئومیکس ..... ۱۴
۱-۳-۳- تفسیر ژنوم ..... ۱۴
۱-۳-۴- بررسی بیان پروتئین ..... ۱۵
۱-۳-۵- عملکرد پروتئین ..... ۱۵
۱-۳-۶- تغییرات پروتئینی ..... ۱۵
۱-۳-۷- استقرار پروتئین ..... ۱۶
۱-۳-۸- برهمکنش پروتئین- پروتئین ..... ۱۶
۱-۳-۹- انواع پروتئومیکس ..... ۱۶
۱-۳-۹-۱- پروتئومیکس ساختاری ..... ۱۶
۱-۳-۹-۲- پروتئومیکس بیان پروتئین ..... ۱۶
۱-۳-۹-۳- پروتئومیکس عملکردی ..... ۱۷
۱-۳-۱۰- تکنولوژی پروتئومیکس ..... ۱۸

۱-۳-۱۰-۱- اساس آنالیز پروتئوم ..... ۱۸

۱-۳-۱۰-۲- تکنیک‌های جداسازی ..... ۱۸

۱-۳-۱۰-۳- استخراج پروتئین از نمونه ..... ۱۸

۱-۳-۱۰-۴- تکنیک‌های جداسازی مبتنی بر الکتروفورز ..... ۲۰

۱-۳-۱۰-۵- الکتروفورز دو بعدی ..... ۲۰

۱-۳-۱۰-۶- آشکار سازی پروتئین‌ها ..... ۲۲

۱-۳-۱۰-۷- آنالیز کمی پروتئین‌ها با نرم افزار ..... ۲۲

۱-۳-۱۱- شناسایی پروتئین‌ها ..... ۲۳

۱-۳-۱۱-۱- تکنیک‌های شناسایی ..... ۲۴

۱-۴- اهمیت ارزیابی الگوی پروتئینی در گیاهان تراریخته ..... ۲۵

۱-۴-۱- این همانی ..... ۲۵

۱-۵- ارزیابی‌های پروتئومیکی انجام شده روی گیاهان تراریخته ..... ۲۷

## فصل دوم

۲-۱- مواد و روش‌ها ..... ۳۱

۲-۱-۱- مواد ژنتیکی مورد استفاده ..... ۳۱

۲-۱- ۲- شرایط کاشت و نمونه‌برداری ..... ۳۱

۲-۲- پروتئومیکس ..... ۳۲

۲-۲-۱- استخراج پروتئین ..... ۳۲

۲-۲-۲- تعیین مقدار کمی(غلظت) پروتئین‌ها ..... ۳۴

۲-۲-۳- الکتروفورز دوبعدی ..... ۳۷

۲-۲-۳-۱- بعد اول ..... ۳۷

۲-۳-۳-۲- تفکیک پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز بعد دوم ..... ۴۱

۲-۲-۴-آشکار سازی نقاط پروتئینی با روش رنگ آمیزی نیترات نقره ..... ۴۵

۲-۲-۵- اکتساب تصاویر، آنالیز ژل‌ها و شناسایی نقاط ..... ۴۸

## فصل سوم

نتایج و بحث ..... ۵۰

۳-۱- بررسی پروتئوم پنبه‌های تراریخته و غیر تراریخته ..... ۵۱

۳-۱-۱- تعیین غلظت نهایی پروتئین‌های استخراج شده ..... ۵۱

۳-۱-۲- بر چسب گذاری پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار ..... ۵۲

۳-۱-۳- تعیین در صد حجمی نقاط بر چسب خورده ..... ۵۷

۳-۱-۴- تعیین نقاط معنی‌دار با استفاده از نرم افزار ..... ۶۲

۳-۱-۵- محاسبه عامل القا ..... ۶۳

**نتیجه‌گیری و پیشنهادات** ..... ۶۶

**منابع** ..... ۶۷

**فهرست جداول**


جدول ۲-۱- مواد لازم جهت تهیه محلول لیزکننده پروتئین..... ۳۴

جدول ۲-۲- نحوه تهیه محلول‌های استاندارد جهت برازش خط رگرسیون..... ۳۶

جدول ۲-۳- میزان پروتئین مورد نیاز جهت ژل‌های ۱۸ و۲۴ سانتیمتری ..... ۳۷

جدول ۲-۴- مواد لازم جهت تهیه محلول آبدهی ..... ۳۸

جدول ۲-۵- تنظیم اجرا برای ژل‌های مورد استفاده در شرایط ثابت دما..... ۴۰

جدول ۲-۶- مواد لازم جهت تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱۴.۷٪ SDS-PAGE ..... ۴۲

جدول۲-۷- مواد لازم جهت تهیه بافر متعادل کننده ..... ۴۳

جدول۲-۸- محلول رانینگ بافر الکتروفورز بعد دوم..... ۴۴

جدول ۲-۹- مواد لازم جهت تهیه تیوسولفات سدیم..... ۴۷

جدول ۲-۱۰- محلول رنگ نیترات نقره ..... ۴۷

جدول ۲-۱۱- محلول آشکار کننده نقاط ..... ۴۷

جدول ۲-۱۲- محلول متوقف کننده رنگ آمیزی..... ۴۸

شکل ۲-۶- آنالیز ژل‌های حاصل از رنگ‌آمیزی توسط نرم افزار MELANI 6..... ۴۹

جدول ۳-۱- غلظت نهایی پروتئین برای رقم BT..... ۵۱

جدول۳-۲- غلظت نهایی پروتئین برای رقم CHITINASE..... ۵۱

جدول۳-۳- غلظت نهایی پروتئین برای رقم KOKER..... ۵۲

جدول۳-۴- غلظت نهایی پروتئین برای رقم SAHEL..... **۵۲**

جدول ۳- ۵- درصد حجمی ۲۰ نقطه پروتئینی از رقم KOKER به عنوان نمونه..... **۵۸**

جدول ۳- ۶- درصد حجمی ۲۰ نقطه پروتئینی از رقم BT به عنوان نمونه..... **۵۹**

جدول ۳- ۷- درصد حجمی ۲۰ نقطه پروتئینی از رقم SAHEL به عنوان نمونه..... **۶۰**

جدول ۳- ۸- درصد حجمی ۲۰ نقطه پروتئینی از رقم CHITINASE به عنوان نمونه..... **۶۱**

جدول ۳-۹- TTEST برای تعدادی از نقاط معنی‌دار در سطح ۱٪..... **۶۲**

**فهرست اشکال**


شکل ۱-۱- گیاه پنبه ..... ۵

شکل ۱-۲- کرم قوزه پنبه ..... ۷

شکل ۱-۳- پژمردگی ورتیسلیومی پنبه ..... ۸

شکل ۱-۴- انواع پروتئومیکس ..... ۱۷

شکل ۲-۱- گیاه پنبه در شرایط گلخانه ..... ۳۱

شکل ۲-۲- قرار دادن نوارهای IPG بر روی سینی REHYDRATION ..... ۳۸

شکل ۲-۳- دستگاه PROTEIN IEF CELL از شرکت BIO RAD ..... ۳۹

شکل ۲-۴- نحوه قرار دادن ژل در دستگاه بعد اول ..... ۳۹

شکل۲-۵- قرار دادن شیشه‌های حاوی ژل اکریل‌آمید در دستگاه PROTEIN II MULTI CELL ..... ۴۵

شکل ۳-۱- بر چسب گذاری لکه‌های پروتئینی روی ژل‌های رقمKOKER ..... ۵۳

شکل۳-۲- بر چسب گذاری لکه‌های پروتئینی روی ژل‌های رقم BT ..... ۵۴

شکل ۳-۳- بر چسب گذاری لکه‌های پروتئینی روی ژل‌های رقم CHITINASE ..... ۵۵

شکل ۳-۴- بر چسب گذاری لکه‌های پروتئینی روی ژل‌های رقم SAHEL ..... ۵۶

شکل ۳-۵- دو برابر افزایش و کاهش بیان در سطح ۱٪ (۰.۵≥IF≥۲) ..... ۶۳

شکل ۳-۶- افزایش و کاهش بیان در سطح ۱٪( ۱.۵≥IF≥۰.۶۷) ..... ۶۴

**چکیده**

**آنالیز پروتئوم پنبه‌های تراریخته با استفاده از الکتروفورز دو بعدی**

**آرمینه حیدریان**

استفاده از گیاهان تراریخته در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ا جمله این گیاهان می‌توان به پنته‌های تراریخته مقاوم به کرم قوزه پنبه و قارچ ورتیسلیوم اشاره کرد. طبق قانون ایمنی زیستی، صدور مجوز به منظور رهاسازی گیاهان تراریخته و استفاده از آن‌ها به عنوان غذا در قبال ارزیابی مخاطرات احتمالی از جمله این همانی، امکان‌پذیر می‌باشد. استفاده از پروتئومیکس، راهی برای نشان دادن اثرات ناخواسته از الحاق تصادفی T-DNA در گیاهان تراریخته می‌شود. بدین منظور، پنبه‌های تراریخته حاوی ژن‌های Bt و کیتیناز و هم‌چنین پنبه شاهد با نام رقم کوکر و رقمی که بیشتر در منطقه کشت می‌شود با نام ساحل را برای آنالیز انتخاب کردیم. ۳ تکرار از هر کدام از ارقام انتخاب شدند و کل پروتئین از برگ استخراج شده و روی ژل اکریلامید آنالیز شد. پس از اتمام مراحل رنگ‌آمیزی و سپس آنالیز لکه‌ها با نرم‌افزار Melanie 6 ، ۸۱۲ لکه پروتئینی تکرار پذیر روی ژل‌ها علامت‌گذاری شد. ۵۱ لکه بین Bt و کوکر و ۳۵ لکه بین ساحل و کوکر و ۴۲ لکه بین کیتیناز و کوکر متفاوت بود،۶ لکه هم بین هر سه رقم دارای تفاوت معنی‌دار بودند. از این بین، تعدادی لکه را به عنوان کاندید برای انجام طیف سنجی جرمی انتخاب کردیم.

**واژه‌های کلیدی:** آنالیز پروتئوم، این همانی، پنبه تراریخته، الکتروفورز دو بعدی.

## Abstract

**Proteome analysis of transgenic cotton by Two Dimensional Gel Electrophoresis**

**Armineh Heydarian**

The use of transgenic plants has been more attention in recent years. Among these plants can be mentioned to the transgenic cotton that resistante to boll worm and verticilium fungi. According to biosafety law, issuing warrant in order to release transgenic plants and use them as food is possible providing that risk assessment of substantial equivalent is conducted. Using Proteomics is a way to show unintendent effects of random insertion of T-DNA in transgenic plants. Hence, transgenic cotton containing BT gene, chitinase and also koker as a control variety and sahel as common variety were chosen to carry out an analysis. Triplet of each variety was chosen and all the protein was extracted and analyzed on Acrylamide gel. After staining and then spots analysis using Melanie 6 were over, 812 repeatable protein spots were labeled on the gels. 51 spots between BT and koker, 35 spots between sahel and koker, 42 spots between chitinase and koker were different. 6 spots were different among all, some spots were chosen as candidates for mass spectrum analysis.

**Key words**: Proteome analysis, Substaintial equivalence, Transgenic cotton, Two dimensional gel electrophoresis.

# مقدمه

## مقدمه

پنبه (*Gossypium spp.*) از زمان‌های ما قبل تاریخ در اقلیم‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا کشت شده است. تولید این گیاه در ایران قدمت زیادی دارد و استان‌های گلستان، خراسان، مازندران و اردبیل از جمله استان‌های تولید کننده عمده این محصول هستند[ آمار صادرات و واردات، ۱۳۸۹].

این محصول علاوه بر این‌که یک گیاه مهم در صنعت به‌شمار می‌رود، دومین گیاه از لحاظ تولید روغن بعد از سویا محسوب می‌شود[ مطالعات آماری و راهبردی صنعت نساجی، ۱۳۸۸]. این محصول مورد حمله آفات و بیماری‌های بسیاری قرار می‌گیرد، لذا برای کنترل این آفات و بیماری‌ها پنبه‌های تراریخته که مقاوم شده به کرم قوزه و قارچ ورتیسلیوم بودند، تولید شد[ Tohidfar et al., 2005, 2008].

توالی‌های DNA خارجی که به گیاه وارد می‌شود، ممکن است تنظیم ژن‌های دیگر یا مسیرهای بیوشیمیایی دیگر را تحت تاثیر قرار دهد[Wang et al., 2011]. مهم‌ترین نگرانی در مورد این تغییرات ژنتیکی ایجاد اثرات ناخواسته حاصل از این توالی‌های جدید است. پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای بررسی اثرات ناخواسته و ارزیابی ایمنی زیستی گیاهان تراریخته است. توسعه این روش تا حدودی به پروژه‌های توالی‌یابی ژنومی و پیشرفت‌ها در طیف سنجی جرمی وابسته است. تکنیک‌های فعلی پروتئومیکس امکان بررسی الگوی بیان تعداد زیادی پروتئین را بر روی یک ژل فراهم آورده‌اند.

ژل الکتروفورز دو بعدی (2-DE)، به عنوان تکنیکی برای مطالعه پروتئین‌ها به مدت ۳۰ سال است که استفاده می‌شود. در طول این مدت اصلاحات اساسی در آن صورت گرفته است. اندازه ژل افزایش یافته، قدرت تفکیک[1] (تعداد لکه قابل تفکیک در ژل) افزایش یافته و امکان ایجاد شیب pH فراهم شده است.

[1]. Resolution

آنالیز پروتئوم شامل جداسازی پروتئین‌ها بر اساس pH ایزوالکتریک در بعد اول و بر اساس وزن مولکولی در بعد دوم می‌باشد. پس از انجام 2-DE انتخاب و جداسازی لکه‌های مورد نظر، آن‌ها را مورد هضم آنزیمی تریپسین قرار داده و پروتئین‌های هضم شده را به وسیله طیف سنجی جرمی آنالیز می‌کنند و سپس با جستجو در بانک اطلاعاتی آن‌ها را شناسایی می‌نمایند.

اگر ژنوم گیاه مورد مطالعه توالی یابی شده باشد انگشت نگاری جرم پپتیدی (PMF) اغلب برای شناسایی پروتئین کفایت می‌کند. زمانی‌که اطلاعات ژنومی در دسترس نباشد توالی یابی پپتیدی به MS/MS برای شناسایی پروتئین ضرورت پیدا می‌کند. استخراج، جداسازی و بررسی پروتئوم گیاهی به واسطه وجود ترکیبات فنلی، رنگدانه، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها با مشکلاتی مواجه است. تکنولوژی پروتئومیکس اجازه می‌دهد که تمام تغییرات را زمانی‌که ژنتیک، مواد غذایی و محیط یک ارگانیسم تغییر می‌کند مشاهده کنیم [Wang et al., 2011; Chassy et al., 2010].

با استفاده از روش پروتئومیکس مقایسه‌ای، می‌توان الگوی بیان پروتئین را بین دو واریته تراریخته و بومی ارزیابی کرده و با نرم افزار آنالیزی وجود تفاوت‌ها را مشاهده کنیم.

**اهداف پژوهش**

۱- بررسی احتمال تولید پروتئین‌های جدید( غیر از پروتئین نوترکیب مورد نظر) در گیاه پنبه

۲- تغییر در میزان بیان پروتئین‌های غیر نوترکیب در گیاهان تراریخته.

# فصل اول

## کلیات و بررسی منابع

## ۱-۱- پنبه

پنبه به عنوان یک محصول کشاورزی، صنعتی و بازرگانی، مهم‌ترین و با ارزش‌ترین لیف طبیعی است که از الیاف پوشاننده دانه گیاهی با نام علمی(*Gossypium*) به دست می‌آید. این گیاه مهم صنعتی بسیار گرمادوست بوده و به هوای گرم و یک فصل رشد بدون یخبندان ۲۰۰ روزه محتاج است [مطالعات آماری و راهبردی صنعت نساجی،۸ ۱۳۸]

**شکل ۱-۱- گیاه پنبه**

### ۱-۱-۱- تولید پنبه

منشا پنبه احتمالا مناطق استوایی افریقاست و سابقه تولید الیاف آن به ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد و به مکزیک برمی‌گردد. در ایران قدیمی‌ترین مناطق کشت پنبه، ساوه و شوشتر بوده است و به دوره هخامنشیان بر می‌گردد [مطالعات آماری و راهبردی صنعت نساجی، ۱۳۸۸]