بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد(M.Sc.)

در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

انتقال سازه ژنی SS-GUS-KDEL-MAR به گیاه توتون و بررسی گیاهان تراریخت

تحقیق و نگارش

محمدرضا قزوینی

استاد راهنما

دکتر خدیجه باقری

استاد مشاور

مهندس رقیه عظیم خانی

پاییز ۱۳۹۱

تشکر و قدردانی

سپاسگزار پروردگار بی همتای بزرگ هستم که نخستین موجود است و پیش از او چیزی نبوده است و آخرین موجود است و بعد از او چیزی نیست. دیده بینندگان از مشاهده او ناتوان است و اندیشه گویندگان از وصف او عاجز است.

از پدر و مادر، برادر و خواهران عزیزم که در تمام مراحل زندگی مرا یاری دادند و صبورانه و صادقانه در تمام مراحل تحصیل مشوق من بوده‌اند خاضعانه سپاسگزارم.

از استاد راهنمای ارجمند و بزرگوارم، سرکار خانم دکتر خدیجه باقری که همیشه مورد لطف و عنایت ایشان بوده‌ام و اجرای این پایان‌نامه بدون راهنمایی‌های علمی و مساعدت‌های فراوان ایشان میسر نبود و صبورانه مرا در این پژوهش یاری کردند نهایت سپاس و قدردانی را دارم.

از استاد مشاور محترم، سرکار خانم مهندس رقیه عظیم خانی که بزرگوارانه مرا در اجرای این پژوهش یاری کردند، سپاسگزارم.

از دوست و یاور خودم، آقای مهندس صابر اصغرزاده که در تمامی مراحل اجرای این پژوهش، بزرگوارانه مرا راهنمایی و مشاوره کرده‌اند نهایت سپاس و امتنان را دارم.

از مسئولین آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی(سرکارخانم مهندس مهری و سرکارخانم مهندس زند) و فیزیولوژی بذر(آقای مهندس زنگانی) و تمامی دوستانم، قدبیگی، دزواره، موسوی، حاج محمدی، صفری، صحرائی، نذیری، صفرزاده، محمدزاده، خوانساری، حاتمیان، کوچی، مرادی، آهنگریان، شیخی، شامه، جمالی، ادبی، حسینی و برزگر که در طول مدت اجرای پایان‌نامه از هیچگونه کمکی دریغ نفرمودند، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

چکیده

از مهمترین فواید تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان می‌توان به اقتصادی بودن آن نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فرآورده‌های بیولوژیکی فعال و مشابه شکل طبیعی، تولید بالای پروتئین نوترکیب و غیره اشاره کرد. از طرف دیگر پایین بودن سطح بیان ترنسژن‌ها و همچنین خاموشی آن‌ها در نسل‌های بعد از مهمترین فاکتورهای محدودکننده در این زمینه می‌باشد. انتخاب بافت مناسب گیاه جهت بیان و نیز بهبود قطعه ژنی از جمله راه‌های افزایش بیان ژن منتقل شده به گیاه می‌باشد. در راستای رسیدن به این هدف در تحقیق حاضر با طراحی و ساخت سازه اختصاصی بذر و انتقال آن به گیاه توتون سعی شده است تا ضمن بیان ژن ***Gus*** در بذر توتون، افزایش بیان این ژن را نیز شاهد باشیم. ابتدا در سازه مدنظر، توالی‌های ***SS*** و ***KDEL*** بعنوان سیگنال نگهدارنده پروتئین در شبکه آندوپلاسمی در بالادست ژن ***Gus***، ژن گزارشگر ***Gus*** بعنوان یک ژن محک، توالی ***MAR*** جهت جلوگیری از خاموشی ژن در پایین دست ژن ***Gus*** تعبیه شد و این قطعه تحت کنترل پیشبرنده اختصاصی بذر ***Napin*** قرار گرفت(این بخش از پژوهش توسط حسینی و همکاران در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه زنجان انجام پذیرفت). ریزنمونه‌های برگی توتون با سازه مذکور و با استفاده از اگروباکتریوم تراریخت شدند. آنالیز گیاهان باززایی شده در سطح ***DNA*** با ***PCR*** و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های ***nptII*** و ***Gus*** نشاندهنده انتقال این ژن‌ها به گیاهچه‌های باززایی شده بود. آزمون ***RT-PCR*** نیز جهت بررسی نسخه برداری از این ژن‌ها در بافت‌های برگی و بذری انجام و نتایج حاصل نشان داد که نسخه برداری از ژن ***nptII*** در هر بافت صورت می‌گیرد در حالیکه نسخه برداری از ژن ***Gus*** تنها در بذر صورت می‌گیرد. این نتیجه با توجه به اینکه پیشبرنده ***NOS*** (کنترل کننده ژن ***nptII***) یک پیشبرنده عمومی و ***Napin*** یک پیشبرنده اختصاصی می‌باشد، مورد انتظار بود. در نهایت با استفاده از ***SDS-Page*** و آزمون هیستوشیمیایی ***Gus***، بیان این ژن در بذر گیاهان گزینش شده مورد بررسی قرار گرفت. وجود باند تقریبا ۶۰***KD*** در گیاهان تراریخت و نیز نتایج حاصل از آزمون هیستوشیمیایی نشاندهنده بیان ژن ***Gus*** در بذور تراریخت توتون بود.

کلمات کلیدی: ژن *GUS*، توالی *SS* ، توالی *KDEL*، توالی *MAR*، پیشبرنده ناپین.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل ۱ مقدمه ۱
فصل ۲ بررسی منابع علمی ٦
۲-۱- انتقال ژن و مهندسی ژنتیک: ۶
۲-۲- اهمیت مهندسی ژنتیک و لزوم استفاده‌از آن در اصلاح نباتات: ۷
۲-۳- مهمترین گیاهان مورد استفاده در کشاورزی مولکولی: ۹
۲-۴- سازه ژنی شیمری ۹
۲-۴-۱-پیشبرنده‌ها ۱۱
۲-۴-۱-۱- پیشبرنده‌های عمومی ۱۲
۲-۴-۱-۲- پیشبرنده‌های اختصاصی بذری ۱۳
۲-۴-۲- ژن‌های گزارشگر ۱۵
۲-۴-۲-۱- معرفی چند ژن گزارشگر ۱۶
۲-۴-۳- جایگاه مرتبط با ماتریکس(*MAR*) ۱۹
۲-۴-۴- توالی سیگنال(*Signal Sequence*) ۲۲
۲-۴-۵- ذخیره سازی پروتئین نوترکیب ۲۳
۲-۵- اصلاحات پس از ترجمه در پروتئینهای نوترکیب ۲۴
۲-۶- روش‌های مهم انتقال ژن به گیاهان ۲۵
۲-۶-۱- استفاده‌از روش بیولیستیک(*Biolistic gun*) ۲۵
۲-۶-۲- روش میکروانژکسیون(*Micro injection*) ۲۵
۲-۶-۳- استفاده‌از روش ایجاد خلا نسبی(*Vacuum infiltration*) ۲۵
۲-۶-۴- انتقال ژن با استفاده‌از اگروباکتریوم(*transfer Agrobacterium mediated gene*)... ۲۶
۲-۶-۴-۱- اساس مولکولی انتقال ژن به وسیله اگروباکتریوم ۲۸
۲-۷- استفاده‌از توتون در تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی ۳۱
فصل ۳ مواد و روش‌ها ۳٤
۳-۱- تهیه مواد: ۳۵
۳-۲- باکتری‌ها ۳۵

۳-۳- آغازگرها ۳۵
۳-۴- ناقل‌ها ۳۶
۳-۵- محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد ۳۶
۳-۵-۱- محیط کشت باکتریایی *LB (Lauria and bertani)* ۳۶
۳-۵-۲- تهیه‌استوک *(Stock)* از کشت باکتری برای نگهداری در دمای $70^{o}c$ - ۳۷
۳-۵-۳- محلول‌های ذخیره‌ای تنظیم‌کننده‌های رشد ۳۷
۳-۵-۳-۱- محلول ذخیره‌ای هورمون *BAP*(بنزیل آمینو پورین *Benzyl Amino Purine*) ۳۷
۳-۵-۳-۲- محلول ذخیره‌ای هورمون *NAA*(*1-Nophthalen Acetic Acid*) ۳۸
۳-۵-۴- غلظت محلول‌های مادری آنتی‌بیوتیک و مقدار مورد استفاده آنها در محیط کشت ... ۳۸
۳-۵-۵- محیط کشت گیاهی*MS (Murashige and Skoog)* ۳۹
۳-۵-۵-۱- محلول مادری مواد غذایی پرمصرف با غلظت *20X* ۴۰
۳-۵-۵-۲- -محلول مادری مواد غذایی کم مصرف با غلظت *100X* ۴۰
۳-۵-۵-۳- محلول مادری ویتامین با غلظت *100X* ۴۱
۳-۵-۵-۴- محلول مادری آهن با غلظت *20X* ۴۱
۳-۵-۵-۵- تهیه محیط کشت *MS (1X)* ۴۲
۳-۵-۵-۶- تهیه محیط تلقیح ۴۲
۳-۵-۵-۷- تهیه محیط هم کشتی ۴۳
۳-۵-۵-۸- محیط گزینشگر *(Selection Media)* ۴۳
۳-۵-۵-۹- تهیه محیط طویل شدن ساقه ۴۴
۳-۵-۵-۱۰- تهیه محیط ریشه‌زایی ۴۴
۳-۶- تراریزش ریزنمونه‌های برگی توتون ۴۴
۳-۶-۱- کاشت بذور ضدعفونی شده توتون ۴۴
۳-۶-۲- ریزازدیادی گیاهان توتون ۴۵
۳-۶-۳- انتقال سازه‌ی ژنی به‌اگروباکتریوم *LBA4404* ***(Agrobacterium tumefaciens)*** ۴۵
۳-۶-۴- اثبات وجود پلاسمید در باکتری با استفاده‌از تکنیک *Colony PCR* ۴۶
۳-۶-۵- تراریخت نمودن ریزنمونه‌ها با استفاده‌از اگروباکتریوم ۴۷
۳-۷- آنالیز گیاهان تراریخت ۴۸
۳-۷-۱- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح *DNA* و بررسی انتقال ژن با استفاده‌از تکنیک *PCR* ۴۸
۳-۷-۱-۱- استخراج *DNA* ژنومی ۴۹

۳-۷-۱-۲- الکتروفورز *DNA*ی ژنومی استخراج شده برروی ژل آگارز ۵۰
۳-۷-۱-۳- بررسی انتقال ژن *GUS* با استفاده‌از تکنیک *PCR* و آغازگرهای اختصاصی *GUS* ۵۱
۳-۷-۱-۴- بررسی انتقال ژن *nptII* با استفاده‌از تکنیک *PCR* و آغازگرهای اختصاصی *nptII* ۵۱
۳-۷-۲- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح ***RNA*** و بررسی انتقال ژن با استفاده‌از ***RT-PCR*** ۵۲
۳-۷-۲-۱- استخراج *RNA* از بذر ۵۲
۳-۷-۲-۲- ساخت *cDNA* ۵۳
۳-۷-۲-۳- انجام *PCR* از روی الگوی *cDNA* با آغازگرهای ژن *nptII* و *GUS* ۵۵
۳-۷-۲-۴- استخراج *RNA* از برگ ۵۵
۳-۷-۳- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح پروتئین و بررسی بیان ژن *GUS* با استفاده‌از تکنیک *SDS-page* ۵۷
۳-۷-۳-۱- استخراج پروتئین ۵۷
۳-۷-۳-۲- آماده سازی نمونه های پروتئین جهت الکتروفورز ۵۸
۳-۷-۳-۳- تهیه محلول های لازم برای الکتروفورز پروتئین بروش ***SDS-Page*** ۵۹
۳-۷-۳-۴- طرز تهیه ژل اکریل آمید ۶۱
۳-۸- آزمون هیستوشیمیایی *GUS* ۶۳
۳-۸-۱- تهیه محلول‌های لازم برای انجام آزمون هیستوشیمیایی *GUS* ۶۴
۳-۸-۲- مراحل انجام آزمون هیستوشیمیایی *GUS* ۶۴
فصل ٤ نتایج ٦٦
۴-۱- انتقال و تایید انتقال سازه *SS-GUS-KDEL-MAR* به اگروباکتریوم *LBA4404* ۶۷
۴-۲- آلوده سازی ریزنمونه‌های توتون با اگروباکتریوم نوترکیب حاوی سازه ۶۷
۴-۳- رشد جوانه‌های تراریخت در محیط گزینشگر ۶۸
۴-۴- انتقال جوانه‌های باززایی شده به محیط‌های گزینشگر جدید ۶۹
۴-۵- انتقال گیاهچه‌ها به محیط طویل شدن ساقه و ریشه‌زایی ۶۹
۴-۶- انتقال گیاهچه‌ها به خاک ۷۰
۴-۷- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح *DNA* با استفاده از تکنیک *PCR* ۷۱
۴-۷-۱- استخراج *DNA* ژنومی از برگ گیاهان باززایی شده ۷۱
۴-۷-۲- نتایج *PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *GUS* ۷۱

۴-۷-۳- نتایج *PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *nptII* ۷۲
۴-۸- بررسی گیاهان تراریخت در سطح *RNA* با استفاده از تکنیک *RT-PCR* ۷۳
۴-۸-۱- استخراج *RNA* از بذر و ساخت *CDNA* ۷۳
۴-۸-۲- تایید نسخه برداری از ژن *GUS* با *RT-PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *GUS* ۷۳
۴-۸-۳- تایید رونویسی از ژن *nptII* در بذر با *RT-PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *nptII* ۷۴
۴-۸-۴- استخراج *RNA* از برگ ۷۵
۴-۸-۵- تایید نسخه برداری از ژن *nptII* در برگ با *RT-PCR* با استفاده از آغازگر اختصاصی *nptII* ۷۶
۴-۸-۶- بررسی نسخه برداری از ژن *GUS* در برگ با *RT-PCR* با استفاده از آغازگر اختصاصی *GUS* ۷۷
۴-۹- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح پروتئین و بررسی بیان ژن *GUS* با تکنیک *SDS-page* ۷۸
۴-۹-۱- بررسی وضعیت پروتئین‌های استخراجی از گیاهان تراریخت در مقایسه با شاهد به روش *SDS-page* ۷۸
۴-۱۰- آزمون هیستوشیمیایی *GUS* ۷۹
فصل ۵ بحث ۸۱
بحث ۸۲
پیشنهادات ۸۹

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل (۲-۱) شکل شماتیک از سازه ژنی ۱۱
شکل (۲-۲) نحوه آلوده شدن سلول گیاهی توسط اگروباکتریوم ۲۷
شکل (۲-۳) نقشه ناقل *Ti* ۲۸
شکل (۳-۱): سازه *SS-GUS-KDEL-MAR* ۳٦
شکل (٤-۱) بررسی انتقال سازه*SS-GUS-KDEL-MAR* به اگروباکتریوم سویه *LBA4404* ٦۷
شکل (٤-۲) ریزنمونه های تلقیح شده در محیط تلقیح ٦۸
شکل (٤-۳) : پیدایش و رشد جوانه های اولیه از ریزنمونه ها برروی محیط گزینشگر ٦۹
شکل (٤-٤) : انتقال گیاهچه های باززایی شده از محیط گزینشگر به محیط طویل شدن ساقه ۷۰
شکل (٤-۵) انتقال گیاهچه ها به پرلایت و خاک ۷۰
شکل (٤-٦). استخراج *DNA* ژنومی از برگ گیاهان باززایی شده ۷۱
شکل (٤-۷) بررسی تراریختی گیاهچه ها با تکنیک *PCR* برای ژن *GUS* ۷۲
شکل (٤-۸) بررسی تراریختی گیاهچه ها با تکنیک *PCR* برای ژن *nptII* ۷۳
شکل (٤-۹) : تایید سنتز *mRNA* با واکنش *RT-PCR(GUS)* ۷٤
شکل (٤-۱۰) : تایید سنتز *mRNA* با واکنش*RT-PCR(nptII)* ۷۵
شکل (٤-۱۱) نتیجه استخراج *RNA* کل برگ بر روی ژل آگارز الکتروفورز ۷٦
شکل (٤-۱۲) : تایید سنتز *mRNA* با واکنش *RT-PCR (nptII)* ۷۷
شکل (٤-۱۳) : تاییدواکنش *RT-PCR (GUS)* ۷۷
شکل (٤-۱٤) مشاهده قطعه ٦۰ کیلودالتونی ۷۸
شکل (٤-۱۵) .آزمون هیستوشیمیایی *GUS* ۸۰

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول (۲-۱) تعدادی از ژن‌های گزارشگر رایج که در مهندسی ژنتیک کاربرد دارند..... ۱۸
جدول (۳-۱) : جفت آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی ژن *nptII* ۳۶
جدول (۳-۲) : جفت آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی ژن *GUS*..... ۳۶
جدول (۳-۳) غلظت محلولهای مادری ذخیرهای آنتی بیوتیک و غلظت مورد استفاده‌انها در محیط کشت *LB* و *MS*..... ۳۸
جدول (۳-٤) نسبت عناصر مورد استفاده در تهیه محیط کشت *MS* با غلظت *1X*..... ۳۹
جدول (۳-۵) : تهیه محلول مادری مواد پر مصرف..... ٤۰
جدول (۳-٦) : تهیه محلول مادری مواد کم مصرف..... ٤۱
جدول (۳-۷) : تهیه محلول مادری ویتامین..... ٤۱
جدول (۳-۸) : تهیه محلول مادری آهن..... ٤۲
جدول (۳-۹) : تهیه محیط کشت..... ٤۲
جدول (۳-۱۰) : مواد تشکیل دهنده بافر استخراج ژنوم و غلظتهای مورد استفاده برای هر ماده. ۵۰
جدول (۳-۱۱) : مقدار مواد مورد استفاده برای انجام واکنش *PCR*..... ۵۱
جدول (۳-۱۲) : برنامه *PCR* شامل زمان و دمای مورد نیاز برای ژن *GUS* و ژن*nptII* ۵۲
جدول (۳-۱۳) تهیه مخلوط اول (*RNA-primer*)..... ۵٤
جدول (۳-۱٤) : تهیه مخلوط سنتز *cDNA*..... ۵٤
جدول (۳-۱۵) ترکیبات محلول استخراج برای استخراج پروتئین بذر..... ۵۸
جدول (۳-۱٦) مقادیر مورد استفاده‌از محلول های ذخیرهای برای تهیه ژل جدا کننده و ژل توده کننده.٦۲
جدول (۳-۱۷) تهیه محلول های لازم برای انجام آزمون هیستوشیمیایی *GUS*..... ٦٤

فصل ۱

مقدمه

تولید زیست داروها و پروتئین‌های مهم کاربردی از طریق گیاهان را اصطلاحا" کشاورزی مولکولی[1] " گویند. نیاز روز افزون به داروهای بیولوژیک و ارزش اقتصادی بالای آنها موجب شده است که استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتورهای طبیعی در تولید داروهای بیولوژیک مورد توجه ویژه قرار گیرد.

گیاهان تراریخت در طی قریب به ربع قرن گذشته توسعه زیادی داشته و از گیاهان ساده ای که تنها ژن‌های گزارشگر یا ژن‌های نشانگر قابل انتخاب را در خود تظاهر می دادند، به گیاهانی که چندین صفت مطلوب را در خود تظاهر می‌دهند، ارتقاء یافتند و می‌توانند برای تولید واکسن و آنتی بادی و سایر داروهای نوترکیب مورد نیاز پزشکی انسانی مورد استفاده قرار گیرند. رویکرد جدید پژوهشگران و شرکت‌های بزرگ و چند ملیتی داروسازی جهان به سمت داروهای تولید شده در گیاهان PMP[2]می‌باشد(قره‌یاضی، ۱۳۸۵).

از جمله مزایای سیستم‌های بیانی گیاهی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱-سیستم‌های گیاهی نسبت به سیستم‌های تخمیری و بیوراکتورها اقتصادی‌تر هستند. به طور کلی، برآورد کرده‌اند که ارزش تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می‌تواند یک دهم تا یک پنجاهم قیمت از تولید همان پروتئین‌ها در فرمانتور و با استفاده از باکتری *E.coli* باشد (Ghislaine et al., 2008).

۲-امکان تولید انبوه پروتئین‌ها با منشا خارجی وجود دارد. تخمین زده می‌شود که میزان تولید پروتئین‌ها در گیاهانی نظیر توتون، سویا و یونجه بیش از ۱۰۰ کیلوگرم به

---

۱ *Molecular Farming*

۲ *Plant Made Pharmaceuticals*

ازای هر هکتار باشد(Maliga., 2002).

۳-امکان استفاده خوراکی از پروتئین‌های تولیدی در گیاهان وجود دارد و لذا می‌توان از فرآیندهای پیچیده تخلیص صرف نظر نمود و به علاوه نیازی به تزریق نیست(Alicia et al., 2007). اما با این حال در تولید داروهای خوراکی موانع متعددی از قبیل: تجزیه پروتئین نوترکیب در دستگاه گوارش و تجویز میزان دز مصرفی وجود دارد که در صورت از میان برداشته شدن آنها می‌توان به تولید داروهای خوراکی امیدوار بود.

٤-امکان بیان پروتئین مورد نظر در قسمت خاصی از گیاه نظیر برگ، ریشه، دانه و یا در اندامک خاصی(نظیر کلروپلاست و میتوکندری) از سلول وجود دارد(Daniell et al., 2002).

٥-خطر بیماری‌های مشترک و آلودگی محصول پروتئینی به عوامل بیماری زایی نظیر HIV، هپاتیت و یا سموم بالقوه خطرناک وجود ندارد.

٦-بر خلاف باکتری‌ها، گیاهان به دلیل تشابه بالا با انسان(به دلیل یوکاریوت بودن هر دو) می‌توانند پروتئین‌های پیچیده را در شکل صحیح خود تولید کنند(Schillberg et al., 2002)

اما با این حال در مقایسه با سایر سیستم‌ها، میزان تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان بنا به دلایلی که ذکر خواهد شد، پایین است(Farran et al., 2002). به عنوان مثال آلبومین سرم انسانی(rHSA) یک پروتئین نوترکیب تولید شده در توتون و سیب زمینی با استفاده از پیشبرنده CaMV35S است(Sijmons et al., 1990) تولید آن در حد تجاری نیست(۰/۰۲ درصد کل پروتئین محلول در برگ ها و جوانه ها و ٥ برابر کمتر در ریشه‌ها و غده‌ها)(Farran et al.,

2002). گیاهان زیادی تاکنون به عنوان بیوراکتور به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از آن جمله می‌توان به گندم، جو، برنج، ذرت از غلات، کاهو از سبزیجات، کلزا از دانه‌های روغنی(Jalali et al., 1998)، سیب زمینی(Beaujean et al., 1998) و گوجه فرنگی(McCormic et al., 1986) اشاره کرد.

از *Agrobacterium tumefaciens* به‌طور گسترده‌ای در انتقال ژن‌های تولید کننده پروتئین-های نوترکیب به گیاهان استفاده شده است. مزایای این روش قرارگیری ژن مورد نظر از طریق *T-DNA*ی باکتری در گیاه مورد نظر و همچنین بیان پایدار ژن منتقل شده می‌باشد.گونه های گیاهی که توسط ناقل اگروباکتریوم و روش های دیگر تراریخت می‌شوند، به طور مداوم در حال رشد است و در حال حاضر توانایی تراریختی بیش از ۱۲۰ گونه گیاهی را در حداقل ۳۵ خانواده پیدا کرده است.

تاکنون گیاه توتون بیشترین استفاده را جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب در بین گونه‌های گیاهی به خود اختصاص داده است. در این میان توتون زراعی (*Nicotiana tabacum*) تاریخچه موفقیت‌آمیز طولانی در تولید پروتئین‌های نوترکیب دارد. توتون یک محصول غیرغذایی و غیرعلوفه‌ای و یک انتخاب مناسب برای تولید پروتئین‌های دارویی است. یکی از دلایل انتخاب آن به علت انعطاف‌پذیری نسبی آن به دستورزی ژنتیکی است. برخلاف بسیاری از بیورآکتورهای گیاهی توتون مناسب‌ترین شرایط را از نظر مسائل ایمنی زیستی دارا است و کمترین احتمال آلودگی زنجیره‌های گیاهی و جانوری را دارا است (Daniell et al., 2001).

از آنجایی که کشور ما در حال توسعه می‌باشد و از طرفی نیل به خودکفایی در محصولات دارویی(به خصوص در زمینه تولید پروتئین‌های نوترکیب دارویی) یک امر اجتناب ناپذیر است،

ضروری است که به فناوری فوق، جهت تولید سریع، ارزان و ایمن پروتئین‌های نوترکیب مورد نیاز جهت مصارف پزشکی دست یابیم.

در طی مراحل انجام این پروژه تحقیقی، ضمن اجرای روش های کشت بافت و باززایی گیاه کامل، روش انتقال ژن با استفاده از اگروباکتروم حامل ژن گزارشگر *Gus* آزمایش گردید.

هدف از این تحقیق افزایش بیان ژن *Gus* با استفاده از توالی های *SS* و *KDEL* و *MAR* در بذور گیاه توتون می‌باشد.

فصل ۲

بررسی منابع علمی

۲-۱- انتقال ژن و مهندسی ژنتیک:

انتقال یک ژن یا قطعه کوچکی از DNA از یک موجود زنده به ژنوتیپ دیگر با کشف آنزیم‌های برشی که مولکول DNA را در محل‌های خاصی (یا توالی‌های معین) می‌توانند برش دهند،ممکن گردید. ساده‌ترین و موفق‌ترین روش انتقال ژن به گیاهان دولپه استفاده‌از اگروباکتریوم است(Binns and Thomashow., 1988). با حذف قدرت بیماری‌زایی این باکتری‌ها می‌توان از آن‌ها برای انتقال ژن استفاده نمود. پس از انتقال ژن به گیاه لازم است ژن انتقال یافته در گیاه قابل تشخیص و شناسایی باشد.

۲-۲- اهمیت مهندسی ژنتیک و لزوم استفاده‌از آن در اصلاح نباتات:

مهندسی ژنتیک عبارتست از تغییر در محتویات ژنتیکی سلول‌ها از طریق دست‌ورزی‌های ژنتیکی در شرایط درون شیشه‌ای(Abuodeh et al., 2000).

با استفاده از مهندسی ژنتیک و به‌نژادی مولکولی می‌توان یک صفت خاص را تغییر داد بطوری که سایر صفات موجود دست نخورده‌باقی بمانند و نیز در این روش صفات غیر دلخواه وارد گیاهان تراریخت نمی‌شوند. درحالی که در اصلاح نباتات سنتی به همراه‌انتقال صفت مطلوب و موردنظر، تعدادی از ژن‌های ناخواسته هم به گیاه‌اصلاحی منتقل می‌شود. همچنین دوره‌اصلاحی و مدت زمان انتقال ژن با استفاده‌از این روش بسیار کوتاهتر از روش سنتی است، زیرا نیازی به چندین نسل تلاقی برگشتی وجود ندارد و نهایتا امکان انتقال ژن یا ژن‌های مطلوب از هر منبع ژنتیکی (مثلا پروکاریوت) به گیاه مورد نظر وجود دارد.

تکنیک‌های مهندسی ژنتیک در سال‌های اخیر دریچه جدیدی بر روی علم اصلاح نباتات

گشود، که عبارتند از:

۱- افزودن ژن یا ژن‌های جدید که‌باعث ایجاد صفات مطلوب و مورد نظر در گیاهان تراریخت می‌گردد.

۲- افزایش میزان بیان ژن یا ژن‌های مطلوب با وارد کردن تعداد کپی بیشتری از ژن یا ژن‌های مورد نظر با استفادهاز تکنیک سنس.

۳- کاهش میزان بیان یا خاموش نمودن ژن یا ژن‌های مورد نظر با استفاده‌از تکنیک آنتی‌سنس.

شایان ذکر است که اولین مهندس ژنتیک، خود طبیعت می‌باشد که باکتری اگروباکتریوم با انتقال ژن خود به گیاهان دو لپه‌ان‌ها را به‌استخدام خود درآورده و ژن باکتری در گیاه‌بیان می‌شود. انسان نیز با الهام از طبیعت است که‌به‌این مهم می‌پردازد و تلاش می‌کند تا اینکه یک یا چند ژن مورد نظر را به گیاه منتقل نماید.

برای اصلاح گیاهان زراعی با استفاده‌از روش مهندسی ژنتیک این مراحل ضروری می‌باشد:

۱-شناخت صفت یا صفات مطلوب مورد نظر

۲-استخراج ژن‌های مطلوب که صفت مورد نظر را کنترل می‌نماید از منابع ژنتیکی

۳-انتقال ژن یا ژن‌های استخراج شده‌به سلول‌های گیاه مورد نظر

٤-تولید گیاهان تراریخت از سلول‌های دست‌ورزی شده و تثبیت صفت یا صفات منتقل شده

۵-بررسی و مطالعه گیاهان تراریخت از نظر تعداد کپی های ژن منتقل شده و میزان بیان ژن

٦- مطالعات دقیق زیست ایمنی گیاهان تراریخت و اطمینان از بی‌خطر بودن آن‌ها برای محیط زیست و اکوسیستم

٧- تکثیر و توزیع واریته جدید(گیاهان تراریخت) در صورت اثبات بی‌خطر بودن آن‌ها برای محیط زیست

٢-٣- مهمترین گیاهان مورد استفاده در کشاورزی مولکولی:

به طور کلی گیاهان مهم برای کشاورزی مولکولی عبارتند از:

I. مواد گیاهی که‌برگ آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند(مانند توتون و یونجه).

II. مواد گیاهی که‌بذور آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند(مانند ذرت، گندم و کلزا).

III. مواد گیاهی که میوه یا ساقه آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند(مانند گوجه فرنگی و سیب‌زمینی).

IV. گیاهان مدل مانند علف تال(آرابیدوپسیس تالیانا) که در تحقیقات ژنتیک گیاهی کاربرد بسیار دارد.

هر کدام از این میزبانان دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند و بسته‌به هدف تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند(Binns et al., 1988).

٢-٤- سازه ژنی شیمری

ژن هسته‌ای از چند منطقه مختلف تشکیل یافته‌است و هر منطقه نقش خاصی را در نسخه‌برداری و ترجمه mRNA بر عهده دارد. با شروع از انتهای ’5، یک ناحیه پیشبرنده که در

شروع نسخه‌برداری دخیل است، همراه‌با نواحی تشدید کننده و خاموش کننده که تنظیم بیان ژن را بر عهده دارند، یک نقطه شروع نسخه‌برداری یا کلاهک، و جعبه‌های به‌اصطلاح CAAT و TATA که‌به‌اتصال RNA پلی مراز کمک می‌کنند، وجود دارند. یک یا چند ناحیه غیر قابل ترجمه یا اینترون نیز در منطقه نسخه‌برداری قرار دارد. پایان منطقه ترجمه توسط یک کدون خاتمه دهنده مشخص می‌شود و به دنبال آن یک ناحیه خاتمه دهنده مشخص می‌شود و در انتهای ’3 با سیگنال پلی‌آدنیلاسیون قرار دارد. در اکثر موارد، صرف نظر از اینکه‌از یک سیستم انتقال مستقیم بدون ناقل و یا از ناقل طبیعی برای انتقال ژن استفاده شود، ژن نشانگر، ژن گزارشگر و ژن‌های مورد نظر را قبل از انتقال، به روش‌های مختلف تغییر می‌دهند. این ژن‌ها را تحت کنترل توالی‌های پیشبرنده، خاتمه دهنده و افزایش دهنده مختلف قرار می‌دهند این چنین ژن‌هایی را ساختارهای ترانس ژن یا شیمری می نامند، زیرا که‌اجزای آن‌ها از مناطق مختلفی منشا گرفته‌است. گیاهان را معمولا با ساختارهای نسبتا ساده‌ای که در آن‌ها ژن مورد نظر با یک پیشبرنده مناسب، یک توالی رهبر در انتهای ’5 ویک خاتمه دهنده در انتهای ’3 جفت می‌شود، تراریخت می نمایند، تا از نسخه‌برداری، پایداری و ترجمه موثر mRNA اطمینان حاصل گردد. پیشبرنده می‌تواند از یک منبع گیاهی، ویروسی و باکتریایی باشد. بعضی پیشبرنده‌ها باعث بیان ژن‌های ساختمانی می‌شوند، در حالیکه بعضی از پیشبرنده‌ها ممکن است به نحوی انتخاب شوند که در یک بافت خاص و یا با تغییر محیط بیان گردند. پیشبرنده‌های با منشا باکتریایی شامل lac، trp و tac و پیشبرنده‌های با منشا ویروسی T3، T7 و SP6 می‌باشند که غالبا از پیشبرنده 35S RNA ویروس موزاییک گل کلم(CaMV) استفاده می‌شود، زیرا که‌این پیشبرنده متعلق به یک ویروس گیاهی می‌باشد و ویروس گیاهی به فاکتورهای نسخه‌برداری و ترجمه در گیاهان وابسته‌اند. این پیشبرنده، حد بالایی از بیان