دانشگاه مازندران
دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

پایان نامه دوره دکتری (Ph.D.) در رشته اصلاح نباتات- بیوتکنولوژی

موضوع:

مهندسی ژنتیک گیاه به منظور بیان پلی هیدروکسی بوتیرات در کلروپلاست توتون

استادهای راهنما:

دکتر نادعلی بابائیان جلودار

دکتر مسعود توحیدفر

نام دانشجو:

مطهره محسن‌پور

آبان ماه ۱۳۹۰

«بسمه تعالی»

دانشگاه مازندران

معاونت آموزشی

تحصیلات تکمیلی

«ارزشیابی پایان‌نامه در جلسه دفاعیه»

مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

نام و نام خانوادگی: معصومه محسن پور شمارهٔ دانشجویی:

رشته تحصیلی: اصلاح نباتات مقطع: دکتری سال تحصیلی:

عنوان پایان‌نامه:

تاریخ دفاع:

نمره پایان‌نامه (به عدد): ۲۰

نمره پایان‌نامه (به حروف): بیست تمام

هیات داوران

استاد راهنما: دکتر [illegible]

استاد راهنما: دکتر توحیدنژاد

استاد مشاور: دکتر [illegible]

استاد مدعو: دکتر [illegible]

استاد مدعو: دکتر غلامعلی رنجبر

نماینده کمیته تحصیلات تکمیلی: دکتر [illegible]

تقدیم به زمین و تمامی تلاشگران خالص و پرامیدش
و تقدیم به خانواده‌ام که آرامش هر روزم مدیون وجود آنهاست

سپاس یگانه ای را که علمش بی انتهاست و به هر که بخواهد بی حساب عطا می کند

و سپاس نعمت های عزیزش پدر و مادرم را که اسطوره های مهربانی و فداکاری اند و خواهر و برادرم که شادابی زندگی اند

و سپاس بزرگوارانی را که خدا بر سر راهم قرار داد که درهای علم و پیشرفت را بر من بگشایند و راه را بر من هموار نمایند.

از استاد و راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر یاسایی به خاطر زحمات، حمایت ها و راهنمایی هایشان در تمام دوران تحصیلات دانشگاهی ام سپاسگزارم

و از استاد و راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر توحید فرکه به پیشرفت امروزم مدیون راهنمایی ها، حمایت ها و امکاناتی است که بی دریغ در اختیارم نهادند، همواره راهنما، پشتیبان و مشوقم بودند و به تلاش هایم ارزش بخشیدند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از تمامی اساتیدم در دانشگاه علوم کشاورزی ساری و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران علی الخصوص اساتید محترمی که داوری پایان نامه را بر عهده داشتند،

جناب آقای دکتر صالحی جوزانی، جناب آقای دکتر مومنی، جناب آقای دکتر رنجبر و جناب آقای دکتر نخعی سپاسگزارم.

از تمامی همکلاسی ها، دوستان و همراهانم در دانشگاه ساری و پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج به خصوص آقای مهندس البرز رنوفی که برادرانه از هیچ نوع تلاش بامیم بود، تشکر می کنم.

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که درهای علم را بر من گشود

و از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) که شیرینی و لذت تحقیق را به من هدیه داد، سپاسگزارم.

چکیده

مهندسی ژنتیک کلروپلاست چندین مزیت منحصر به فرد نسبت به انتقال ژن به هسته ارائه می‌دهد. بیان بسیار بالای پروتئین‌های نوترکیب، درون سیستم‌های مهندسی شده پلاستیدی، روشی موثر و ارزشمند را برای استفاده از گیاه به عنوان بیورآکتور مطرح می‌کند. در این تحقیق با طراحی و ساخت ناقل‌های مناسب عمومی و اختصاصی برای انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان، تلاش شد تا گام موثری به عنوان گزینه‌ای جایگزین برای تراریزش هسته‌ای برداشته شود. لذا با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی ژنوم‌های پلاستیدی موجود در بانک‌های اطلاعاتی، قسمتی از توالی پلاستوم به عنوان توالی هدف‌گیری‌کنندهٔ ژن خارجی به ژنوم کلروپلاستی انتخاب گردید که دارای طول مناسب برای ایجاد نوترکیبی همولوگ و الحاق در پلاستوم، ناحیهٔ آغاز همانندسازی اختصاصی پلاستوم، هدف‌گیری ژن در ناحیهٔ تکرار معکوس پلاستیدی و جایگاه‌های آنزیمی منحصر به فرد در مرکز توالی برای الحاق ژن خارجی باشد. توالی‌های مجاور یا هدف‌گیری کننده با طراحی یک جفت پرایمر از نواحی حفاظت شده مورد نظر از پلاستوم‌های توتون و ۷ گیاه دیگر، جداسازی و کلون‌سازی شد. سپس با افزودن نواحی تنظیمی مختلف شامل پیشبرها و پایانبرهای دائمی کلروپلاستی و القایی، نواحی بدون ترجمه یا UTRهای مناسب، نواحی اتصال ریبوزوم پلاستیدی، جایگاه‌های آنزیمی مناسبِ ورود ژن برای بیان انفرادی و یا پلی‌سیسترونی، ژن گزارش‌گر، ژن‌های نشانگر انتخابی آنتی‌بیوتیکی و غیرآنتی‌بیوتیکی و توالی‌هایی برای حذف ژن نشانگر پس از انتقال ژن، تلاش شد تا انواع مختلفی از حامل های کلروپلاستی ساخته شوند تا بتوان بیان هر ژن خارجی را به طور دلخواه در ژنوم‌های پلاستیدی گیاهان مختلف به صورت کارا امکان‌پذیر نمود. صحت ساخت ناقل های کلروپلاستی توسط آنالیزهای ملکولی مختلف تایید گردید. از سویی دیگر جداسازی و ساخت کاست بیانی برای گروه ژنی (اُپران) پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) و کلون‌سازی آن در ناقل بیانی و ناقل‌های کلروپلاستی به منظور انتقال آن به ژنوم پلاستیدی برای دستیابی به تولید ارزان پلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات به عنوان پلاستیک زیست‌تخریب‌پذیر که دارای بسیاری از ویژگی‌های پلاستیک‌های نفتی بوده و دارای کاربردهای صنعتی مهمی نیز نظیر ساخت کپسول‌های قابل تجزیه زیستی برای رهاسازی دارو در درازمدت، نخ بخیه، بیوپلیمر جایگزین استخوان و غیره، می‌باشد، انجام گرفت. صحت جداسازی و کلون‌سازی و بیان هر سه ژن اُپران PHB توسط آنالیزهای مختلف PCR، هضم آنزیمی و کروماتوگرافی گازی تایید گردید و در نهایت پلیمر مذکور توسط باکتری‌های نوترکیب ساخته شده در این تحقیق تولید و استخراج گردید. از سویی دیگر سیستمی با قرار دادن پیشبر شوک حرارتی *E. coli* (*groE*) در ناقل پلاستیدی و ساخت سیگما فاکتور هیبرید گیاه- باکتری تحت یک پیشبر مختص بافت طراحی گردید تا بتوان بر مشکل کاهش رشد و یا باروری گیاه در انتقال ژن به پلاستید که اغلب به دلیل اثرات تولید دائمی محصول تراژن ایجاد می‌گردد نیز غلبه نمود. به طوری که با ترکیب موتیف‌های قسمت N-ترمینال شبه سیگما فاکتور توتون که علاوه بر توالی نشانه برای ورود به کلروپلاست دارای موتیف برهمکنش با پلیمراز کلروپلاستی می‌باشد با موتیف‌های قسمت C-ترمینال فاکتور سیگما ۳۲ی *E. coli* که قدرت تشخیص و اتصال به پروموتر *groE* را دارد، یک فاکتور سیگمای هیبرید گیاه *E. coli* طراحی گردید. این موتیف‌ها با طراحی پرایمر از توالی نوکلئوتیدی فاکتور سیگمای باکتری و گیاه تکثیر شد و اتصال آنها به هم با استفاده از SOEing PCR طوری انجام گرفت که چهارچوب باز خواندنی (ORF) اصلی در فاکتور سیگمای هیبرید حاصل حفظ گردد. سپس این ژن هیبرید موسوم به HSig طی مراحلی به منظور اختصاصی‌کردن بیان ژن در پلاستیدهای گیاهی با افزودن نواحی تنظیمی در وکتور اگروباکتریومی پس از حذف ژن نشانگر انتخابی کلون‌سازی شد. از وکتور نوترکیب حاصل برای انتقال ژن به رقم ایرانی توتون استفاده گردید و ردیابی گیاهان تراریخته باززاشده روی محیط غیرانتخابی توسط آنالیز PCR انجام شد. الحاق ژن HSig و کپی‌شمار آن در ژنوم گیاه تراریخته به ترتیب توسط آنالیزهای سادرن بلات و Real time PCR تعیین شد. بیان ژن HSig و هدف‌گیری آن به پلاستید توسط بیان ومشاهده پروتئین فلورسنت سبز (GFP) پس از انتقال کاست بیانی طراحی شده برای *gfp* تحت پیشبر *groE* در ناقل pFNGi به کلروپلاست توتون توسط تفنگ ژنی اثبات شد. سپس سه ژن اُپران PHB جایگزین *gfp* در ناقل کلروپلاستی گردید و توسط دو ناقل pFNPi و pFNP به پلاستید توتون منتقل شد. آنالیز PCR حضور اُپران را در گیاهان ترانسپلاستومی حاصل تایید نمود. سیستمی که برای بیان PHB در ژنوم کلروپلاستی طراحی و ساخته شد این قابلیت را خواهد داشت که با جایگزینی هر ژن دلخواه دیگری به جای PHB استفاده و به عنوان زمینه‌ای کارا و سازگار با مسائل زیست محیطی و برای ایجاد صفات مطلوب زراعی و نیز تولید پروتئین‌های درمانی، واکسن‌ها و مواد زیستی، به کار رود.

واژه‌های کلیدی:

پلی هیدروکسی بوتیرات، توتون، حامل پلاستیدی، سیگما فاکتور هیبرید، مهندسی ژنتیک کلروپلاست.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱- مقدمه	۱
۲- فصل اول: بررسی منابع	۷
۲-۱- مهندسی ژنتیک کلروپلاست	۷
۲-۲- استفاده از گیاهان تراپلاستی به عنوان بیورآکتور	۸
۲-۳حامل‌های پلاستیدی	۱۱
۲-۳-۱- نسل اول حامل‌های پلاستیدی	۱۱
۲-۳-۲- حامل‌های چند سیسترونی	۱۱
۲-۳-۳- حامل‌های بسط اُپران	۱۲
۲-۳-۴- حامل‌های انتقال ژن گسسته	۱۲
۲-۳-۵- نشانگرهای انتخابی مورد استفاده در انتقال ژن به پلاستیدها	۱۲
۲-۴- روش‌های انتقال ژن به پلاستید	۱۳
۲-۴-۱- بیولیستیک	۱۳
۲-۴-۲- انتقال ژن به واسطه پلی اتیلن گلیکول	۱۳
۲-۴-۳- روش جدیدی با میکروانجکشن (Galistan expantion Femtosyringe)	۱۴
۲-۵- بیان تنظیمی و انتخابی تراژن‌ها در پلاستید	۱۴
۲-۶- انتقال ژن بدون نشانگر آنتی‌بیوتیکی	۱۶
۲-۷- پلی‌هیدروکسی آلکانوات (PHA)	۱۶
۲-۸- ترکیب مونومری و خصوصیات فیزیکی PHAها	۱۷
۲-۹- تجزیه‌پذیری زیستی PHA	۱۹
۲-۱۰- سنتز PHA در گیاهان تراریخته	۲۱
۲-۱۱- موانع افزایش تولید PHA در گیاهان	۲۱
۲-۱۲- محدودنگه‌داشتن تراژن	۲۲
۲-۱۳- سیستم‌های انتقال ژن بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها	۲۲
۳- فصل دوم: مواد و روش‌ها	۲۴
۳-۱- بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای یافتن بهترین محل الحاق ژن به ژنوم کلروپلاستی	۲۴
۳-۲- جداسازی ناحیهٔ هدف‌گیری‌کننده	۲۵
۳-۳- کلون کردن ناحیهٔ هدف گیری‌کننده و ساخت حامل نوترکیب	۲۶
۳-۴- طراحی نواحی تنظیمی و ژن‌های نشانگر و گزارش‌گر برای حامل‌های پلاستیدی	۲۶
۳-۵- طراحی و ساخت کاست ژن نشانگر *neo* ادغام شده با زیرواحد بزرگ *atpB* بین توالی‌های *loxP*	۲۷
۳-۶- طراحی و ساخت حامل بیانی کلروپلاستی دارای پیشبر باکتریایی *groE* برای بیان ژن‌های موردنظر به صورت القایی یا مختص بافت در پلاستیدهای گیاهی	۲۷
۳-۷- طراحی و ساخت حامل بیانی کلروپلاستی دارای کاست ژنی کلروپلاستی *neo* و کاست ژنی القایی *gfp*	۲۸
۳-۸- بیان پلی‌سیسترونی پروتئین فلورسنت سبز تحت پروموتر کلروپلاستی در باکتری نوترکیب	۲۸
۳-۹- استفاده از ژن نشانگر غیر آنتی‌بیوتیکی بتائین‌آلدهید دِهیدروژناز در طراحی حامل پلاستیدی	۲۹

عنوان	صفحه
۳-۹-۱- طراحی و کلون‌سازی کاست ژنی BADH	۲۹
۳-۹-۲- کلون‌سازی کاست BADH در مرکز ناحیهٔ FR و ساخت حامل کلروپلاستی	۳۰
۳-۱۰- آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه-باکتری	۳۱
۳-۱۱- ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری	۳۱
۳-۱۲- حذف ژن نشانگر انتخابی از پلاسمید دوگانه اگروباکتریومی	۳۲
۳-۱۳- کلون‌سازی سیگما فاکتور هیبرید در وکتور آگروباکتریومی فاقد ژن نشانگر	۳۳
۳-۱۴- مواد گیاهی	۳۳
۳-۱۵- همکشتی با آگروباکتریوم و باززایی گیاهان	۳۳
۳-۱۶- آنالیز گیاهان باززاشده از لحاظ تراریختی	۳۴
۳-۱۷- انتقال به محیط ریشه‌زایی	۳۵
۳-۱۸- آنالیز سادرن بلات	۳۵
۳-۱۹- تخمین کپی‌شمار تراژن با استفاده از Real-Time PCR	۳۵
۳-۲۰- استخراج RNA و آنالیز cDNAی تراژن	۳۶
۳-۲۱- تراریزش پلاستید و بیان *gfp*	۳۶
۳-۲۲- جداسازی اُپران ژنی PHB	۳۷
۳-۲۲- کلون سازی و بیان اُپران پلی‌هیدروکسی بوتیرات در حامل بیانی pET28a	۳۸
۳-۲۳- کلون سازی PHB در وکتورهای پلاستیدی	۳۸
۳-۲۴- کروماتوگرافی گازی	۳۹
۳-۲۵- استخراج PHB	۴۰
۳-۲۶- انتقال PHB به گیاه توسط تفنگ ژنی	۴۰
۴- فصل سوم: نتایج	۴۲
۴-۱- آنالیز و جداسازی ناحیه مجاور (ناحیه هدف‌گیری کننده) کلروپلاستی	۴۲
۴-۲- آنالیزهای ناحیهٔ هدف‌گیری‌کنندهٔ کلون‌شده	۴۴
۴-۳- طراحی نواحی تنظیمی و ژن‌های نشانگر و گزارش‌گر برای حامل‌های پلاستیدی	۴۸
۴-۴- طراحی و ساخت حامل کلروپلاستی دارای نشانگر *neo* ادغام شده با زیرواحد بزرگ *atpB* بین توالی‌های *loxP*	۴۸
۴-۵- طراحی و ساخت حامل بیانی کلروپلاستی دارای پیشبر باکتریایی *groE* برای بیان ژن‌های موردنظر به صورت القایی یا مختص بافت در پلاستیدهای گیاهی	۴۹
۴-۶- طراحی و ساخت حامل بیانی کلروپلاستی دارای کاست ژنی کلروپلاستی *neo* و کاست ژنی القایی *gfp*	۵۲
۴-۷- بیان پلی‌سیسترونی پروتئین فلورسنت سبز تحت پروموتر کلروپلاستی در باکتری نوترکیب	۵۳
۴-۸- استفاده از ژن نشانگر غیر آنتی‌بیوتیکی بتائین‌آلدهید دهیدروژناز در طراحی حامل پلاستیدی	۵۶
۴-۹- آنالیزهای بیوانفورماتیکی به منظور ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه-باکتری	۵۷
۴-۱۰- ساخت فاکتور سیگمای هیبرید گیاه/باکتری	۶۰
۴-۱۱- حذف ژن نشانگر انتخابی از پلاسمید دوگانه اگروباکتریومی	۶۱
۴-۱۲- کلون‌سازی سیگما فاکتور هیبرید در وکتور آگروباکتریومی فاقد ژن نشانگر	۶۴
۴-۱۳- آنالیز گیاهان باززاشده از لحاظ تراریختی	۶۸
۴-۱۴- تخمین کپی‌شمار تراژن با استفاده از real-time PCR	۷۰

عنوان	صفحه
۴-۱۵- آنالیز رونویسی	۷۱
۴-۱۶- آنالیز بیان GFP	۷۲
۴-۱۷- جداسازی اُپران ژنی PHB	۷۴
۴-۱۸- کلون سازی PHB در وکتورهای پلاستیدی و انتقال ژن	۷۷
۴-۱۹- تولید و استخراج PHB	۷۹
۴-۲۰- انتقال PHB به گیاه توسط تفنگ ژنی	۸۰
۵- فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری	۸۳
۵-۱- ساخت حامل‌های انتقال ژن به پلاستید	۸۳
۵-۲- ساخت سیگما فاکتور هیبرید	۸۶
۵-۳- بیان القایی ژن در پلاستید	۸۸
۵-۴- سنتز PHB در باکتری نوترکیب و پلاستیدهای گیاهی	۹۰
نتیجه‌گیری کلی	۹۳
پیشنهادات	۹۵
منابع	۹۷

۱- مقدمه

محبوبیت گیاهان به عنوان بیورآکتورهایی برای تولید پروتئین‌های مهم تجاری در حال افزایش است. تراریزش پلاستید که اخیرا برای این منظور توسعه یافته است، دارای چندین مزیت است: ۱) هر واحد ملکولی ژنوم کلروپلاستی نسبتا اندازه کوچکی در حدود ۱۵۰kb دارد که نوترکیبی همولوگ را آسان می‌کند و اجازه ایجاد تغییرات و اصلاحات DNA نظیر حذف و اضافه در جایگاه‌های مورد نظر کروموزوم کلروپلاستی را می‌دهد. این در حالی است که انتقال قطعات DNA به درون ژنوم هسته‌ای از روش معروف آگروباکتریوم، DNA را به صورت تصادفی وارد ژنوم می‌کند؛ ۲) سازماندهی ژنوم کلروپلاستی به صورت پروکاریوتی است و بنابراین پدیده‌های پیچیده‌ای نظیر اثرات مکانی و کنترل‌های اپی‌ژنتیکی که در تنظیم ژن با آنها مواجهیم، وجود ندارد؛ ۳) کروموزوم کلروپلاست دارای تعداد نسخه‌های زیادی (بیشتر از ۱۰۰ عدد) در کلروپلاست بالغ می‌باشد. به‌طوری‌که مثلا در یک سلول مزوفیل که دارای تقریبا ۱۰۰ کلروپلاست می‌باشد، حدود ۱۰ هزار کپی کروموزوم پلاستیدی وجود دارد. در نتیجه مقدار پروتئین بیان شده در اثر واردکردن یک ژن خارجی در ژنوم کلروپلاستی می‌تواند بسیار بالا باشد. به‌طوری‌که در گزارشاتی، بالای ۴۵ درصد کل پروتئین‌ها قابل حل سلولی را دربرگرفته است؛ ۴) و بالاخره اینکه اکثر گونه‌های گیاهی که از نظر زراعی مورد توجهند ژنوم کلروپلاستی خود را توسط دانه گرده منتقل نمی‌کنند، به‌طوری‌که کلروپلاست‌های آنها به صورت مادری به ارث می‌رسند. وراثت مادری مانع از انتشار ژن و انتقال آن به دیگر گونه‌های گیاهی غیرتراریخته و خویشاوند می‌شود. علاوه بر اینها حضور چاپرون‌ها و آنزیم‌های درون

کلروپلاستی به مونتاژ کردن پروتئین‌های پیچیده چند زیرواحدی و نیز به تا خوردن صحیح پروتئین‌های دارای پیوندهای دی-سولفیدی کمک کرده و در نتیجه هزینه‌های مراحل تهیه این‌ویترو را به شدت کاهش می‌دهد [۳۹].

ژنوم کلروپلاستی (پلاستوم) گیاهان دارای سازماندهی بسیار حفاظت‌شده‌ای است. این ژنوم یک کروموزوم منفرد حلقوی و دارای همانندسازی مستقل بوده که می‌توان چهار قسمت برای آن در نظر گرفت. این قسمت‌ها شامل دو نسخه یکسان از یک تکرار معکوس (IR)[1] می‌باشد، که نواحی تک نسخه‌ای بزرگ (LSC)[2] و کوچک (SSC)[3] را از هم جدا می‌کند. در سال‌های اخیر با افزایش تعداد ژنوم‌های کلروپلاستی که به طور کامل توالی‌یابی شده‌اند و در دسترس بودن آنها از طریق پایگاه‌های بیوانفورماتیک، دانش ما از سازماندهی و تکامل ژنوم‌های کلروپلاستی در حال گسترش است [۷۶، ۱۰۸].

ناقل‌های انتقال ژن به پلاستید از ناقل‌های *E. coli* مشتق شده‌اند که در آنها توالی‌های DNAی کلروپلاستی با طول یک تا دو کیلوباز در هر دو طرف یک ژن نشانگر انتخابی کلون‌سازی می‌شود و محل‌هایی نیز برای کلون‌کردن ژن مورد نظر در آنها تعبیه خواهد شد. توالی‌های ژنوم کلروپلاستی (ptDNA) به عنوان نواحی مجاور[4] (FR) یا نواحی هدف‌گیری‌کننده برای الحاق مستقیم قطعات مورد نظر به داخل ژنوم پلاستید عمل می‌کنند. ناقل پلاستیدی ابتدا در *E. coli* تکثیر شده و سپس به درون پلاستیدها فرستاده می‌شوند و سرانجام ژن نشانگر و ژن دلخواه از طریق دو رویداد نوترکیبی همولوگ در مکان هدف ژنوم پلاستیدی ادغام می‌گردند. ژن‌های کلروپلاست توسط پیشبرهای اختصاصی کلروپلاست رونویسی شده و از سیگنال‌های پایانبر اختصاصی کلروپلاستی استفاده می‌کنند. اغلب ژن‌های کلروپلاست در گروه‌های ژنی رونویسی می‌شوند. این امر اجازه می‌دهد دو یا چند چارچوب بازخواندنی (ORF)[5]، به درون یک ناقل، در توالی‌هایی تحت یک پیشبر وارد شوند. نشانگر انتخابی و ژن‌های دلخواه بین پیشبر و پایانبر، در مجاورت نواحی بدون رونویسی (UTR) ´۵ و ´۳ قرار داده می‌شوند [۶۸]. استفاده از نواحی تنظیمی مناسب در ساخت ناقل‌های کلروپلاستی می‌تواند نقش بسزایی در بیان مناسب ژن خارجی مورد نظر ایفا کند [۶۰، ۱۰۸]. برای بیان تراژن‌های پلاستیدی معمولاً از یک کاست 5'PL (PL به معنای پیشبر و توالی رهبر است) و یک کاست T (T به معنی پایانبر است)، استفاده می‌شود. کاست PL شامل یک پیشبر و توالی‌های کنترل‌کنندهٔ ترجمه می‌باشد. توالی‌های کنترل‌کنندهٔ ترجمه ممکن است نواحی بدون ترجمهٔ ´۵ از mRNA (5'UTR) و یا

[1] Inverted Repeat
[2] Large Single Copy region
[3] Small Single Copy region
[4] Flanking Region
[5] Open Reading Frame

ناحیهٔ کنترل ترجمهٔ ´۵ (TCR)[1] باشند که 5'UTR و یک قطعهٔ پایانهٔ N از ناحیهٔ کدکننده را شامل می‌شود. ناحیهٔ 5´UTR از mRNA معمولاً شامل یک ساختار ساقه–حلقه[2] است که برای پایداری mRNA مورد نیاز می‌باشد و توالی‌هایی دارد که حرکت mRNAها را روی ریبوزوم تسهیل می‌کنند. کاست T، ناحیهٔ بدون ترجمهٔ ´۳ از mRNA (3´UTR) را کد می‌کند که این قسمت نیز یک ساختار ساقه – حلقه را شامل می‌گردد. ناحیهٔ بدون ترجمهٔ ´۳ به عنوان یک پایانبر رونویسی عمل می‌کند و برای پایداری mRNA موردنیاز است [۷۵].

شناخت توالی‌های ژنوم کلروپلاست به منظور شناسایی نواحی جداگر برای الحاق تراژن در مکان‌های مناسب، از طریق نوترکیبی همولوگ و نیز به منظور شناسایی توالی‌های تنظیمی کلروپلاستی برای بیان مطلوب تراژن ضروری می‌باشد. مشخص شده است که حدود ۴۰ الی ۵۰ درصد ژنوم‌های کلروپلاستی را نواحی غیرکُدکنندهٔ جداگر و تنظیمی دربرمی‌گیرند. با این حال فقدان توالی‌های ژنومی کامل کلروپلاستی هنوز یکی از محدودیت‌های عمدهٔ گسترش تکنولوژی مهندسی پلاستوم در محصولات عمده و سودمند می‌باشد [۱۵، ۱۷، ۶۷، ۹۰]. اگرچه موارد موفقیت‌آمیز زیادی در مهندسی پلاستید توتون از سال‌ها پیش گزارش شده و اساسی برای کارهای متنوع و بیشتر آن در سایر محصولات پایه‌ریزی کرده است، این تکنولوژی نتوانست تا مدت‌ها به بسیاری از محصولات عمده بسط داده شود. ناقل‌هایی که برای تراریزش کلروپلاست استفاده می‌شوند، دارای توالی‌های مجاور گرفته شده از توتون یا آرابیدوپسیس هستند که می‌تواند یکی از دلایل پایین بودن کارایی تراریزش در محصولات دیگر باشد. این در حالی است که ساخت ناقل‌های اختصاصی هر گونه گیاهی که در آنها از توالی‌های اختصاصی همان گونه استفاده می‌شود، به طور چشمگیری کارایی تراریزش پلاستید را بالا می‌برد [۱۰۸].

گیاه توتون به عنوان سیستمی پایه برای انتقال ژن به کلروپلاست مطرح می‌باشد که کارا بودن توتون برای بیان پروتئین‌های نوترکیب را نشان می‌دهد، گیاه توتون می‌تواند به عنوان کارخانه‌ای زنده برای تولید پروتئین‌ها و آنزیم‌ها استفاده شود که این مواد می‌توانند استخراج و خالص سازی شوند و برای ساختن مواد دارویی و ترکیبات صنعتی با ارزش دیگری نظیر بیوپلیمرها استفاده گردند.

پلی هیدروکسی آلکانوآت‌ها (PHA) یک گروه از پلیمرهای خطی هستند که به صورت طبیعی توسط باکتری‌ها از طریق تخمیر قندها یا لیپیدها تولید می‌شوند. عمومی ترین نوع PHAها، پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) می‌باشد که بسیار از

[1] Translation control Region
[2] Stem-Loop

لحاظ تجاری قابل توجه بوده، زیرا به عنوان ماده پلاستیکی زیست تخریب‌پذیر[1] عمل می‌کند. این نوع پلاستیک‌ها از طریق بیولوژیک قابل تجزیه‌اند و توسط میکروارگانسیم‌ها در خاک یا فاضلاب‌ها به CO_2 و آب تجزیه می‌شوند. مزیت دیگر بیوپلیمرها، اقتصادی بودن این مواد است، زیرا تولید بیوپلیمر نیازی به صنعت پیشرفته ندارد و با حداقل امکانات می‌توان به تولید آن مبادرت ورزید. از سوی دیگر با توجه به قیمت بالای نفت خام و محدود بودن منابع آن، استفاده از منابع نفتی برای تولید مواد پلاستیکی، که هم آلوده کننده محیط زیست هستند و هم در جامعه ما ارزش چندانی ندارند، کاری غیر اقتصادی است. بنابراین با توجه به اینکه PHB بسیاری از ویژگی‌های پلاستیک نفتی را دارد، می‌تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای پلاستیک‌های تجزیه ناپذیرکنونی باشد. بیوپلیمر PHB به دلیل داشتن گرمای ذوب بالا (۱۷۰^0C) برای ساخت ظروف بسته‌بندی، بطری‌ها و سایر موادی که نیاز به تحمل حرارت دارند، بسیار مناسب است. علاوه بر آن پلاستیک‌های قابل تجزیه بیولوژیک می‌توانند کاربردهای صنعتی مهمی نیز داشته باشند. نظیر ساخت کپسول‌های قابل تجزیه زیستی برای رهاسازی دارو در درازمدت، نخ بخیه، بیوپلیمر جایگزین استخوان و غیره.

پلاستیک‌ها در تولید فراورده‌های مختلف صنعتی به کار می‌روند، ولی این مواد به عنوان زباله‌های پایدار به تجزیه میکروبی، چالش‌های زیست‌محیطی پیچیده‌ای را به بار آورده‌اند. چون علاوه بر اینکه مکان‌های دفع زباله را پر کرده‌اند، سالانه حجمی برابر چند هزار تن به محیط دریایی وارد می‌شوند. بنابراین دفع مواد زاید پلاستیکی دشواری‌های پر هزینه‌ای را ایجاد می‌کند. چون این مواد نسبتا تجزیه ناپذیر بوده، لذا دوام یافته و برای محیط خطرناک و زیان آور هستند. پلاستیک‌های معمول در بازار از فراورده‌های نفتی تولید شده و برگشت آنها به محیط چند هزار سال طول می‌کشد. دلیل اصلی زیست‌تخریب‌پذیر نبودن پلاستیک‌های معمول، طویل بودن طول مولکول پلیمر و پیوند قوی بین مونومرهای آن است که تجزیه آن را توسط میکروارگانسیم‌های تجزیه‌کننده با مشکل مواجه می‌سازد. بنابراین تولید پلاستیک‌های زیست تخریب پذیر، برای رفع این مشکلات بسیار موثر خواهد بود. با توجه به اینکه عده‌ای از میکروارگانسیم‌ها، پلی بتاهیدروکسی بوتیرات (PHB) را به صورت کربن آلی ذخیره و تولید می‌کنند می‌توان از آنها جهت تولید بیوپلیمرها استفاده نمود. بیوپلیمر PHB از نظر ساختار مولکولی و خواص فیزیکی با پلیمر پرمصرف پلی‌پروپیلن شباهت‌هایی را نشان می‌دهد. تفاوت بین این دو ماده قابلیت تجزیه زیستی می‌باشد. پلی‌پروپیلن نسبت به تجزیه بسیار مقاوم است، درحالی‌که PHB در محیط‌های مختلف سرانجام کاملاً تجزیه می‌شود. اختلاف بین چگالی دو پلیمر در قابلیت تجزیه زیستی آنها نقش دارد. چگالی پروپیلن کمتر از آب است.

[1] Biodegradable

در نتیجه اجسامی که از جنس پروپیلن هستند در آب شناور می‌مانند. بر عکس چگالی بالاتر در موارد ساخته شده از PHB موجب فرو رفتن آنها در قعر لایه‌های رسوبی شده که در آنجا تجزیه می‌شوند.

مواد بیوپلیمری که توسط میکروارگانیسم‌ها ساخته می‌شوند در چرخه‌های بیولوژیک قرار گرفته و به سرعت به محیط زیست برمی‌گردند. پس هیچگاه منابع آن محدود و تمام شدنی نیست در حالی که مواد پلیمری و پلاستیکی امروزی از سوخت‌های فسیلی ساخته می شوند که با توجه به محدود بودن منابع نفتی باید به تدریج با بیوپلیمرهایی که از منابع تجزیه‌پذیر ساخته می‌شوند، جایگزین گردند. نشان داده شده که PHB می‌تواند در گیاهان تراریخته سنتز شود. به دلیل اینکه پلی‌استرهای باکتریایی از نظر قیمت بتوانند با پلاستیک‌های مشتق شده از نفت نظیر پلی‌اتیلن رقابت کنند، استفاده از گیاهان مهندسی شده را برای بیان ارزان و بالای این ژن‌ها مطرح می‌سازد. زیرا تولید توده باکتری‌ها گران‌تر از تولید توده گیاهی است. از آنجایی که تولید PHB در باکتری‌ها بر اساس تخمیر بوده و به منابع کربن مثل گلوکز تکیه دارد، سنتز PHB در گیاهان که بر پایه دی اکسیدکربن و نور است، روش مقرون به صرفه‌تری برای تولید بیوپلیمر در مقادیر زیاد ارائه می‌دهد. بنابراین جداسازی ژن‌های درگیر در فرایند تولید PHB از باکتری و انتقال و بیان آنها در گیاهان می‌تواند راهگشا باشد.

استفاده از تکنولوژی انتقال ژن به پلاستید به خاطر مشکلاتی نظیر مشکل بودن دستیابی به بیان تنظیمی و انتخابی تراژن‌ها محدود شده است. بنابراین ژن‌های خارجی به صورت خودسرشت در تمامی مراحل رشد و نموی گیاه بیان می‌شوند، در نتیجه، رشد گیاه اغلب به خاطر اثرات مضر تولید محصول تراژن مختل می‌گردد.

از آنجایی که همولوژی بالای توالی‌های انتخابی مجاور برای انجام نوترکیبی همولوگ و برای هدف‌گیری ژن خارجی مورد نظر به محل خاص و مناسبی از ژنوم کلروپلاستی از عوامل مهم موفقیت در انتقال ژن به ژنوم کلروپلاستی محسوب می‌شود [۳۵، ۵۰، ۵۱]. لذا هدف از این تحقیق آنالیز و شناسایی توالی ژنوم‌های پلاستیدی گیاهان مختلف به منظور یافتن ناحیهٔ مناسبی از ژنوم پلاستومی برای هدف‌گیری و الحاق ژن خارجی و جداسازی و کلون‌کردن آنها جهت انتقال ژن کارا به کلروپلاست دامنهٔ بسیار گسترده‌ای از گیاهان بود. در این تحقیق ساخت ناقل‌های اختصاصی کلروپلاستی به چندین شکل مختلف به همراه نواحی تنظیمی القایی و غیرالقایی، نواحی بدون ترجمه یا UTRهای مناسب، نواحی اتصال ریبوزوم پلاستیدی، جایگاه‌های آنزیمی مناسبِ ورود ژن برای بیان انفرادی و یا پلی‌سیسترونی، ژن گزارش‌گر و ژن‌های نشانگر انتخابی آنتی‌بیوتیکی و غیرآنتی‌بیوتیکی و توالی‌هایی برای حذف ژن نشانگر مدنظر قرار گرفت. این تحقیق با هدف ساخت حامل‌های مناسب برای انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان از طریق کلون‌سازی توالی‌های اختصاصی ژنوم کلروپلاستی آنها،

انجام گرفت تا گام موثری به عنوان گزینه‌ای جایگزین برای تراریزش هسته‌ای مطرح کند، که می‌توان از آن به عنوان زمینه‌ای کارا و سازگار با مسائل زیست محیطی برای ایجاد صفات مطلوب زراعی و نیز تولید پروتئین‌های درمانی، واکسن‌ها و مواد زیستی، استفاده نمود.

علاوه بر استفاده از پیشبرهای دائمی[1] کلروپلاستی در این ناقل‌ها، که بیان دائمی ژن مورد نظر را باعث می‌گردند، یکی از اهداف این تحقیق ایجاد سیستمی با استفاده از پیشبر شوک حرارتی *E. coli* و ساخت سیگما فاکتور هیبرید برای بیان اختصاصی و یا قابل القای ژن خارجی در ژنوم کلروپلاستی بود تا مشکل کاهش رشد احتمالی در اثر بیان دائمی و بالای تراژن در گیاهان ترانس‌پلاستومی، برطرف گردد.

جداسازی ژن‌های *phbA*، *phbB* و *phbC* (گروه ژنی PHB) از ژنوم باکتریایی *آلکالیژنز یوتروفوس* (*Alcaligenes eutrophus*) و کلون‌سازی این گروه ژنی در ناقل انتقال ژن به کلروپلاست برای بیان مناسب در پلاستیدهای گیاهی از جمله اهداف دیگر این تحقیق بود. این ژن‌ها که پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر را تولید می‌کنند، دارای ارزش اقتصادی و تجاری و موارد مصرفی گوناگونی در پزشکی و صنعت می‌باشند. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد PHB که آن را به عنوان پلیمر با ارزشی مطرح کرده است و با توجه به هزینه‌های بالای تولید آن توسط میکروارگانیسم‌ها این تحقیق در نظر داشت تا با طراحی کاست بیانی مناسب برای بیان آن در باکتری نوترکیب و پلاستیدهای گیاهی راه را برای تولید ارزان و اقتصادی آن باز کند.

سیستم‌های ناقلی که برای انتقال و بیان ژن در کلروپلاست طراحی و ساخته شدند، این قابلیت را خواهند داشت که برای انتقال و بیان هر ژن دلخواه دیگری نیز استفاده گردند.

[1] Constitutive

۲- فصل اول

بررسی منابع

۲-۱- مهندسی ژنتیک کلروپلاست

مهندسی ژنتیک کلروپلاست نسبت به هسته چندین مزیت منحصر به فرد را ارائه می‌دهد که شامل: بیان بالای تراژن [۲۵، ۳۱، ۹۰]؛ انتقال چند ژن در یک رویداد انتقال ژن [۲۰، ۳۱، ۹۱]؛ کاهش احتمال فرار تراژن به دلیل وجود وراثت مادری[1] [۱۸، ۱۹، ۴۲]؛ فقدان خاموشی ژن [۳۱، ۵۳]؛ فقدان اثرات مکانی [۲۶] و پلیوتروپیک [۵۳، ۱۰۸] و فقدان DNA خارجی ناخواسته می‌باشد.

تاکنون بیش از ۴۰ تراژن در ژنوم کلروپلاستی توتون به طور پایدار الحاق و بیان شده‌اند که ایجاد صفات مهم زراعی و نیز بیان مواد زیستی و پروتئین‌های درمانی ارزشمند اقتصادی را ایجاد کرده‌اند. انتقال ژن پایدار به کلروپلاست گونه‌های گیاهی دیگر نیز در حال پیشرفت می‌باشد (تعدادی از این پیشرفت‌ها در جدول ۱-۲ و ۲-۲ نشان داده شده است). بیان بسیار بالای پروتئین‌های نوترکیب، درون سیستم‌های مهندسی شده پلاستیدی، روشی موثر و ارزشمند را برای استفاده از گیاه به

[1] Transgene containment

عنوان بیورآکتور مطرح می‌کند. علاوه بر این حضور چاپرون‌ها و آنزیم‌های درون کلروپلاستی به مونتاژ کردن پروتئین‌های پیچیده چند زیرواحدی و نیز به تا خوردن صحیح پروتئین‌های دارای پیوندهای دی-سولفیدی کمک کرده و در نتیجه هزینه‌های مراحل تهیه این‌ویترو را به شدت کاهش می‌دهد [۲۱، ۲۳]. تاکنون چندین واکسن با موفقیت در ژنوم کلروپلاست بیان شده‌اند [۵۶].

براساس تحقیقات انجام شده، ورود ژن نشانگر هیچ تداخلی با بیان ژن‌های پلاستیدی مجاور ۱۴ ناحیه بین ژنی در پلاستوم نداشت. قطعات DNAی پلاستیدی که حاوی هر یک از این ۱۴ مکان ورود بین ژنی خنثی می‌باشند، این قابلیت را دارند که برای طراحی ناقل‌های انتقال ژن پلاستیدی از آنها استفاده گردد [۶۸]. ژن‌های کلروپلاست توسط پیشبرهای اختصاصی کلروپلاست رونویسی شده و از سیگنال‌های پایانبر اختصاصی کلروپلاستی استفاده می‌کنند. اغلب ژن‌های کلروپلاست در گروه‌های ژنی رونویسی می‌شوند. این امر اجازه می‌دهد دو یا چند چارچوب بازخواندنی (ORF)، به درون یک ناقل، در توالی‌هایی تحت یک پیشبر وارد شوند. نشانگر انتخابی و ژن‌های دلخواه بین پیشبر و پایانبر، در مجاورت نواحی بدون رونویسی ´۵ و ´۳ (UTR) قرار داده می‌شوند. [۶۸]. استفاده از نواحی تنظیمی مناسب در ساخت ناقل‌های کلروپلاستی می‌تواند نقش بسزایی در بیان مناسب ژن خارجی مورد نظر ایفا کند [۶۰، ۱۰۸].

۲-۲- استفاده از گیاهان تراپلاستی به عنوان بیورآکتور

مهندسی ژنتیک، انقلابی در استفاده از پروتئین‌های ارزشمند با خواص درمانی، در معالجات طبی و مصارف صنعتی، ایجاد نموده است. امروزه امکان بیان ژن‌های بیگانه، در سیستمهای بسیار مختلفی میسر شده است و بنابراین تعیین اینکه کدام سیستم، بیشترین کارایی را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، ارائه می‌دهد، ضروری است. یک سیستم بیانی، زمانی ایده‌آل است که بتواند موادی ایمن و فعال از لحاظ بیولوژیکی را با کمترین هزینه تولید نماید. از سلول‌های پستانداران برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده شده است، ولی این سلول‌ها کشت پرهزینه‌ای داشته و برای بهینه‌سازی تولید پروتئین در مقیاس زیاد مناسب نمی‌باشند. استفاده از میکروارگانیسم‌هایی نظیر *E. coli*، معمولاً برای کاربردهای صنعتی و تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس زیاد رایج است، ولی این روش معایبی به همراه دارد که از جمله آنها می‌توان به عدم گلیکوزیله شدن، عدم تا خوردن مناسب و عدم تشکیل باندهای دی‌سولفید در پروتئین‌های حاصل اشاره نمود. نسبت به امکانات صنعتی که در آنها از سیستم‌های تخمیری، حیوانات تراریخته و یا کشت‌های سلولی پستانداران استفاده می‌شود،

سیستم‌های گیاهی، بسیار اقتصادی‌ترند. برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان چندین روش ایجاد شده است که در آنها از ژنوم هسته‌ای و ناقلین ویروسی استفاده می‌شود تا پروتئین‌هایی را دربرگ، دانه، غده و سلول‌های حاصل از کشت بافت بیان نمایند [۳۷، ۶۲، ۱۰۱]، ولی بیان ژن‌های بیگانه حتی در ژنوم هسته‌ای گیاهان نیز پایین و مایوس‌کننده است.

جدول ۲-۱: پیشرفت‌های بیوتکنولوژی با استفاده از مهندسی ژنتیک کلروپلاست برای ایجاد صفات زراعی

صفت یا محصول	ژن	منبع
صفات زراعی		
مقاومت به حشرات	*cry1A(c)*	[۷۰]
مقاومت به حشرات	*cry2Aa2*	[۳۱]
مقاومت به بیماری	*msi-99*	[۳۲]
مقاومت به بیماری	پکتات لیاز	[۱۰۷]
مقاومت به بیماری	*RC101*	[۵۲]
تحمل خشکی	*tps1*	[۵۳]
فیتوریمیدیشن (گیاه پالایی)	*merA,B*	[۹۱]
مقاومت به علفکش	*aroA*	[۲۴]
مقاومت به علفکش/سویا	*hppd*	[۳۴]
مقاومت به شوری/هویج	*badh*	[۵۰]
نرعقیمی	*phaA*	[۹۲]
مقاومت به سرما	Δ^9desaturase	[۱۶]

به دلیل اینکه تکنولوژی برداشت و فرآوری گیاهان و محصولات گیاهی قبلاً توسعه یافته است، قاعدتاً استفاده از مهندسی پلاستید گیاهی برای تولید ترکیبات نوترکیب در مقیاس زیاد نباید هزینه‌های بهینه‌سازی بالایی را متحمل سازد [۲۸]. جذاب‌ترین مزیت استفاده از مهندسی پلاستید در گیاهان، بالا بودن قابل توجه سطوح بیان و سرعت طراحی یک مدل تراریخته است. پلاستیدها، کارایی بالایی برای بیان پروتئین‌های بزرگ از خود نشان داده‌اند، به طوری که تجمع پروتوکسین‌های ۱۳۳ کیلودالتونی Cry1A به میزان ۳ تا ۵ درصد پروتئین کل در برگ‌ها مشاهده شده است [۷۰]. بیان پپتید مگاینین[1] که از ۲۲ اسیدآمینه تشکیل شده نیز کارایی پلاستیدها را برای بیان پروتئین‌های کوچک نشان داده است [۳۲]. کلروپلاست‌های تراریخته، بیورآکتورهای ایده‌آلی برای تولید پروتئین‌های درمانی به شمار می‌روند، به‌طوری‌که پروتئین‌های

[1] Magainin

حاصل دارای عملکرد بوده و در روشی سازگار با محیط زیست تولید می‌شوند. استفاده از پلاستیدها همچنین روشی کم‌هزینه برای تولید واکسن‌ها ارائه می‌کند. واکسن‌های تولید شده در پلاستیدها، می‌توانند به سادگی خالص‌سازی شده و یـا بـه شـکل خوراکی مورد استفاده قرار گیرند. تولید مقرون‌به‌صرفه بسیاری از مواد زیستی با ارزش صنعتی نیز از طریـق ژنـوم پلاسـتیدی حاصل شده است [۲۳].

جدول ۲-۲: مهندسی بعضی از مواد درمانی، آنتی‌ژن‌های واکسن و مواد زیستی از طریق ژنوم پلاستید

صفت/محصول ژن	ژن	پیشبر و UTRهای ۵´/۳´	منبع
پروتئین‌های درمانی			
سوماتوتروپین انسانی	*hST*	Prrn/*T7* gene10/T*rps*16 PpsbA/Trps16	[۹۹]
انسولین- شبه فاکتور رشد	*IGF-1n IGF-1s*	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۲۲]
اینترفرون آلفا	*IFNα2b*	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۵]
سرم آلبومین انسانی	*hsa*	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۳۶]
اینترفرون گاما	*Gus-IFN-γ*	P*psb*A/T*psb*A	[۵۴]
آنتی بادی منوکلونال	*Guy's 13*	Prrn/ggagg/T*psb*A	[۲۱]
پروانسولین انسانی	*CTB-Pins*	P*psb*A/T*psb*A Prrn/*T7* gene10/T*rps*16	[۸۹]
آنتی‌ژن‌های واکسن			
توکسین وبا	*ctx*B	Prrn/ggagg/T*psb*A	[۳۰ ،۲۶]
توکسین کزاز	*tet*C باکتریایی و مصنوعی	Prrn/T7gene 10/T*rbc*L *atp*B/T*rbc*L	[۱۰۵]
کانینه پاروا ویروس	CTB-2L21 GFP-2L21	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۷۴]
سیاه‌زخم (PA)	*pag*	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	
آمیبیازیس	*lec*A	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۱۳]
طائون	*Ca*F1-*Lcr*V	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۹۷]
روتاویروس	*VP*6	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۶]
هپاتیت C	*NS*3	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۲۲]
بیماری لایم	*Osp*A *Osp*A-T	P*psb*A/T*psb*A	[۳۸]
مواد زیستی			
پلیمر مشتق‌شده از الاستین	*EG*121	Prrn/*T7* gene 10/T*psb*A	[۴۰]
p- هیدروکسی‌بنزوئیک اسید	*ubi*C	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۱۱۰]
پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات	phb operon	P*psb*A/T*psb*A	[۵۸]
زیلاناز	*xyn*A	P*psb*A/T*psb*A	[۵۴]
تریپتوفان	*ASA*2	Prrn/*rbc*L/*rp*L32 *rbc*L/*acc*D-*ORF*184	[۱۱۵]
مونلین	*monellin*	Prrn/P*psb*A/T*psb*A	[۸۷]

برای اصلاح ژنتیکی پایدار پلاستیدها دو روش به کاربرده شده است. اول اینکه به منظور الحاق DNAی انتقالی، این DNA با استفاده از توالی‌های همولوگ به مکان مشخصی از ژنوم پلاستید هدف‌گیری شود و دوم طراحی و معرفی ناقل‌های دوگانه‌ای است که دارای همانندسازی مستقل باشند. اما نتایج رضایت بخش تنها زمانی حاصل می‌شود که DNA ی انتقالی در ژنوم پلاستیدی به طور پایدار الحاق گردد [۶۸].

همولوژی بالای توالی‌های انتخابی مجاور برای انجام نوترکیبی همولوگ و برای هدف‌گیری ژن خارجی مورد نظر به محل خاص و مناسبی از ژنوم کلروپلاستی از عوامل مهم موفقیت در انتقال ژن به ژنوم کلروپلاستی محسوب می‌شود [۳۴، ۵۰، ۵۱].

دفرمانتل و همکاران (۲۰۰۴) و کومار و همکاران (۲۰۰۴a, b) با ساخت وکتورهای اختصاصی برای سویا، هویج و پنبه افزایش کارایی انتقال ژن به پلاستید گیاهان مذکور گزارش دادند.

۲-۳حامل‌های پلاستیدی

۲-۳-۱- نسل اول حامل‌های پلاستیدی

گروه پلاسمیدهای pPRV [۱۱۶] و پلاسمیدهای pRB94/95 [۸۸]، اولین نسل حامل‌های پلاستیدی می‌باشند. در این حامل‌های پلاسمیدی، ژن‌های نشانگر به یک مکان کلون‌سازی چندتایی (MCS) متصل شده است. در این حامل‌ها، ژن نشانگر و ژن مورد نظر دارای توالی‌های تنظیمی ′۵ و ′۳ (یعنی پیشبرها و پایانبرهای رونویسی) مختص خود می باشند [۶۶، ۶۹].

۲-۳-۲- حامل‌های چند سیسترونی[1]

پلاسمید pPRV110L، یک حامل *loxp* چند سیسترونی برای وارد کردن هدف‌گیری شده قطعه DNAی مورد نظر در ناحیه بین ژنی *trnV/3'-rps12* می‌باشد. این حامل را چند سیسترونی می‌گویند، به این دلیل که ژن *aadA* هیچ پیشبری ندارد، اما کلون‌کردن یک ژن یا بیشتر به همراه پیشبر در فرادست ژن *aadA*، رونویسی ژن *aadA* را از پیشبر فرادست تضمین می‌کند. و در نتیجه *aadA* آخرین چهارچوب خواندنی برای اُپران می‌شود [۶۰].

[1]- Polycistronic Vectors