دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه :

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان :

جداسازی راه اندازهای اختصاصی بذر از گیاه آفتابگردان (*Helianthus annus* L.)

استاد راهنما :

دکتر بهرام باغبان کهنه روز

استاد مشاور :

دکتراشرف قلیزاده

دانشجو:

زهره بهامین

بهمن 1388

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

نام خانوادگی: **بهامین** نام: **زهره**

عنوان پایان‌نامه: **جداسازی راه‌اندازهای اختصاصی بذر از گیاه آفتابگردان *(Helianthus annus L.)***

استاد راهنما: **دکتر بهرام باغبان کهنه روز** استاد مشاور: **دکتر اشرف قلیزاده**

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: **بیوتکنولوژی کشاورزی** دانشگاه : **تبریز**

دانشکده: **کشاورزی** تاریخ فارغ التحصیلی: 88/11/27 تعداد صفحه: 86

واژه‌های کلیدی: **آفتابگردان**، ***Helianthus annus* L.**، **راه‌اندازاختصاصی بذر**، **راه‌انداز آلبومین 2S**.

چکیده: آفتابگردان به خاطر داشتن مصارف مهم خوراکی، دارویی، صنعتی و... در بین سایر دانه‌های روغنی جایگاه ویژه دارد. از آنجایی که عمده ارزش تغذیه‌ای واقتصادی این گیاه در بذور آن نهفته است و بذور منابع مهم پروتئین، کربوهیدرات و روغن می باشند، اصلاح ژنتیکی در راستای بهبود کیفیت و کمیت صفات مرتبط با دانه‌ی آفتابگردان اهمیت پیدا کرده است. در مهندسی ژنتیک این صفات و هدفگیری بذر آفتابگردان، نیاز به استفاده از راه‌اندازهای اختصاصی بذر است. بنابراین همسانه‌سازی آن ضرورت این تحقیق را آشکار میسازد. در این تحقیق جداسازی و همسانه‌سازی راه‌انداز اختصاصی از ژن آلبومین در دو رقم بنام‌های آلتار و R21×330 انجام گرفت. بدین منظور ابتدا بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک و با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo5 و Primer3 آغازگرهای اختصاصی طراحی شد. پس از تکثیر قطعات مورد نظر با پی سی آر، محصولات حاصله پس از برش با آنزیمهای برشی *Hind*III و *Bam*HI و سوار کردن در پلاسمید pBluescript II KS همسانه‌سازی شدند. تایید کلنی‌های تراریخته و مثبت (سفید) بواسطه داشتن قطعه راه‌انداز، با کلنی پی سی آر و استفاده از آنزیم‌های برشی و الکتروفورز ژل آگارز، انجام شد. پس از توالی یابی کلون‌ها، تفاوت‌ها و تشابهات قطعه راه‌انداز همسانه‌سازی شده با اطلاعات موجود در شبکه بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که راه‌انداز همسانه‌سازی شده در نواحی گوناگون دارای تغییرات نوکلئوتیدی درج، حذف و جایگزینی است. با این توصیف که محل این تغییرات شامل جعبه‌ی TATA و جعبه‌ی CAAT و ناحیه‌ی UTR و ناحیه آغاز ترجمه نمی‌گردد. با بیان این راه‌انداز در وکتور بیان بیان ژن میتوان تاثیر تغییرات نوکلئوتیدی را در میزان و نحوه بیان مشاهده نمود. همچنین عملکرد و کارایی ناحیه UTR در بیان ژن مشخص خواهد گردید.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

عنوان صفحه

مقدمه.....1

بررسی منابع

1-1-مبداء و تاریخچه آفتابگردان در ایران وجهان.....5
2-1-ژنتیک آفتابگردان.....5
3-1- گیاهشناسی آفتابگردان.....6
4-1- اهمیت آفتابگردان.....7
5-1- اهمیت بذر.....8
1-5-1- بذور خزانه های طبیعی انباشت پروتئین..... 9
6-1- پروتئین ذخیره‌ای آلبومین.....10
7-1- راه‌انداز یا پیش‌بر.....12
8-1- اهمیت راه‌اندازها.....13
9-1- تقسیم بندی راه‌اندازها.....14
1-9-1- راه‌اندازهای ساختاری.....14
1-1-9-1- معایب بیان ساختاری.....15
2-9-1- راه‌اندازهای اختصاصی.....15
1-2-9-1- راه اندازهای اختصاصی بذر.....16
10-1- اهمیت نواحی حفاظت شده در راه‌اندازهای اختصاصی بذر.....16

مواد وروش‌ها

1-2- مواد.....20
1-1-2- مواد گیاهی.....20
2-1-2- سویه باکتریایی.....20
3-1-2- محیط کشت باکتری.....20
1-3-1-2- محیط کشت مایع LB. 20
2-3-1-2- محیط کشت جامد LB-agar..... 21

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2-1-3-3- آنتی بیوتیک.....21
2-1-3-4- محلول ذخیره IPTG 0 /8M در آب.....21
2-1-3-5- محلول ذخیره X-gal 20mg/ml.....22
2-1-3-6- کشت گلیسرول.....22
2-1-4- حامل پلاسمیدی.....22
2-1-5- محلول ذخیره Tris-HCl نیم مولار با pH =8.....24
2-1-6- محلول ذخیره EDTA نیم مولار باpH =8 24
2-1-7- محلول‌های 1و2و3 استخراج پلاسمید.....24
2-1-8- ژل آگارز.....25
2-1-8-1- بافرX TBE ۵.....25.
2-1-8-2- بافر بارگذاری Loadig dye.....26
2-1-8-3- محلول ذخیره رنگ آمیزی EtBr.....26
2-1-8-4- نشانگرهای وزن مولکولی.....26
2-1-9- آنزیم‌ها.....27
2-1-9-1- آنزیم‌های برشی.....27
2-1-9-1-1- آنزیم *Hin*dIII.....27
2-1-9-1-2- آنزیم *Bam*HI.....29
2-1-9-2- آنزیم *T4* DNA Ligase.....30
2-1-9-3- آنزیم *RNase* A 30
2-1-9-4- *Taq* DNA polymerase.....31.
2-1-10-اجزای پی سی آر.....31
2-1-11-کیت‌ها.....32
2-1-11-1- کیت استخراج پلاسمید.....32
2-1-10-2- کیت استخراج DNA از ژل.....33
2-2- روش‌ها.....34
2-2-1- بررسی‌های بیوانفورماتیک 34
2-2-2-استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB.....36
2-2-3- الکتروفورز ژل آگارز.....37.
2-2-4- تکثیر توالی‌های مورد نظر با استفاده از پی سی آر.....37.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2-2-4-1- مراحل پی‌سی‌آر 38
2-2-5- هضم آنزیمی..... 39
2-2-6- تخلیص DNA حامل پلاسمیدی و DNA درجی از ژل آگارز..... 40
2-2-7- اتصال قطعه راه‌انداز به پلاسمید..... 41
2-2-8- تهیه سلولهای مستعد برای تراریخته‌سازی..... 42
2-2-9- تراریخته سازی باکتری های مستعد..... 43
2-2-10- غربال کردن کلون های نوترکیب..... 44
2-2-11- تأیید مولکولی کلنی‌های مثبت..... 45
2-2-11-1- انجام کلنی پی سی آر..... 45.

2-2-11-2- استخراج پلاسمید..... 46
2-2-11-2-1- استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی..... 46
2-2-11-2-2- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت..... 47
2-2-11-3- برش توسط آنزیم های *Bam*HI ،*Hin*dIII 49
2-2-12- توالی یابی کلنی‌های مثبت 50
2-2-13- بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی..... 50

نتایج وبحث

3-1- بررسیهای بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرهای اختصاصی..... 52
3-2- کشت گیاهان در گلخانه..... 53
3-3- استخراج DNA ژنومی 54
3-4- تکثیر راه‌انداز آلبومین با پی‌سی آر..... 56
3-5- استخراج پلاسمید pBluescript II KS و هضم آنزیمی آن..... 58
3-6- هضم آنزیمی قطعات تکثیر یافته..... 59
3-7- آماده‌سازی DNA حامل پلاسمیدی و DNA درجی..... 60
3-8- بررسی کمی و کیفی قطعات تخلیص شده از..... 62
3-9- اتصال قطعه راه‌انداز به حامل پلاسمیدی..... 64

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3-10- تراریخت سازی باکتری *E.coli*..... 64
3-11- تایید مولکولی کلنی‌های مثبت با استفاده از کلنی پی سی آر.....65
3-12- جداسازی پلاسمید نوترکیب و تایید مولکولی با استفاده از هضم آنزیمی.....66
3-13- توالی یابی راه‌اندازهای همسانه‌سازی شده.....69
3-14- بررسی همولوژی نتایج حاصله با اطلاعات موجود در شبکه اطلاعات.....72
3-15- مقایسه‌ی توالی‌های حاصله از دو واریته.....78
3-15- نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات.....80
منابع.....83

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مقدمه

Introduction

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مقدمه

روغن‌ها و چربی‌ها یکی از مهمترین منابع تامین انرژی انسان به شمار می روند. روغن‌های گیاهی فاقد کلسترول بوده و به علت تامین کالری مورد نیاز بدن به عنوان انرژی‌زاترین و فشرده‌ترین منبع سوخت‌وساز پس از هیدروکربن‌ها از اهمیتی فوق العاده برخوردار می باشند. از دیگر کاربردهای صنعتی روغن‌های گیاهی به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع با زنجیره ی بسیار بلند VLCPUFAs [1] تولید سوخت‌های زیستی[2] است. بررسی روند شتابان شکوفایی و اقتصادی در کشورهای جهان بیانگر ارزش افزوده چشمگیر در بخش کشاورزی بوده و تولیدات نباتات روغنی جایگاه ویژه‌ای را در مقایسه با سایر گیاهان به خود اختصاص داده‌اند. وابستگی کشور به واردات روغن و کنجاله خارجی و نیز اهمیت این فراورده‌ها در تغذیه ی انسان، دام و طیور موجب توجه ویژه به دانه‌های روغنی و به تبع آن تحقیقات مربوط به این گیاهان در سال‌های اخیر شده است.

روغن آفتابگردان از بذر آن استحصال می شود و عمده ارزش غذایی و اقتصادی این گیاه مربوط به بذر آن می‌باشد همچنین دانه‌ها می توانند برای تولید فراورده‌های خاصی همچون واکسن‌های خوراکی، روغن‌های صنعتی و... استفاده شوند. با توجه به اینکه تولید بسیاری از این فراورده‌ها مختص بذور می باشد شناسایی و جداسازی عناصر تنظیمی برای استفاده در دستورزی بیان ژن‌های خودی[3] و هترولوگ‌ها[4] در بذور گیاهی نیز از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. برای مثال عناصر تنظیمی خاص بذور در دستورزی ژن‌های مربوط به سنتز اسیدهای چرب و متابولیسم لیپیدها در دانه‌های گیاهی مفید هستند.

1-Very long chain polyunsaturated fatty acids
2-Biofuels
3-Native
4-Heterologous

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

یکی از دلایلی که طی دو دهه‌ی گذشته بیوتکنولوژی از اهمیت زیادی برخوردار شده بهره‌مندی از تکنولوژی DNA نوترکیب می باشد. گرچه امروزه بسیاری از تولیدات مفید را می‌توان از کشت میکروبی به دست آورد اما این تولیدات شامل کلیه ترکیبات مورد نیاز بشر نیستند. به طور مثال، بسیاری از داروهای مهم را نمی‌توان از طریق کشت میکروبی تهیه نمود و بدین جهت این محصولات توسط میکروارگانیسم-های عالی‌تر مثل مخمر ساخته می شوند. یک آلترناتیو مناسب به جای یوکاریوت‌های تک سلولی استفاده از سیستم سلول‌های گیاهی است.

یکی از مهمترین فاکتورهای محدود کننده مهندسی ژنتیک گیاهی، پایین بودن سطح بیان ژن‌های انتقال داده شده به گیاهان تراریخته است. فعالیت تنظیمی راه‌اندازها در رونویسی به طور وسیعی برای بهبود کارایی سیستم تراریخت گیاهی و رفع این مشکل مورد مطالعه قرار می گیرند. مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به گیاه نیازمند وجود راه‌اندازهای اختصاصی قوی می باشد. درانتقال ژن جدید به گیاه، اگر راه‌انداز مورد استفاده خودی باشد ژن منتقل شده بهتر و بیشتر بیان خواهد شد. با توجه به اهمیت گیاه آفتابگردان به جهت تولید روغن، این گیاه یک هدف مناسب برای مهندسی ژنتیک و تغییر خصوصیات روغن می باشد. از اینرو با در دست داشتن راه‌اندازهای قوی بذری می‌توان موفقیت‌های بیشتری را در انتقال ژن‌های جدید و یا افزایش بیان ژن‌های از قبل موجود شاهد بود. در این تحقیق، همسانه‌سازی یک راه‌انداز اختصاصی پروتئینی بذر بنام آلبومین از واریته‌های آلتار و R21×330 هدف‌گیری شده است. از این راه‌انداز می توان به منظور تولید فراورده‌های بیولوژیکی در بذور و یا بهبود تولیدات حاصل از بذور استفاده نمود. با توجه به اینکه هیچ نوع تحقیق در جداسازی و همسانه‌سازی راه‌انداز آلبومین در کشور و از این گیاه گزارش نشده است، امید می-رود این راه‌انداز و استفاده از آن در پروژه‌های انتقال ژن مثمر ثمر واقع گردد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فصل اول

بررسی منابع

Bibliography

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-1- مبداء و تاریخچه آفتابگردان در ایران وجهان

آفتابگردان گیاهی علفی است و متعلق به جنس هلیانتوس و تیره کاسنی[5] می‌باشد. جنس هلیانتوس بیش از 60 گونه دارد. هلیانتوس از ترکیب دو کلمه یونانی Helios به معنی آفتاب و anthus به معنی گل گرفته شده است. این نام را لینه برای این گیاه انتخاب نموده است (ناصری، 1370).

گیاه آفتابگردان نخست به عنوان گیاه زینتی کشت می‌شد و در سال 1570 از امریکای جنوبی به اروپا برده شده ودر سده 18 میلادی نخستین بار به عنوان گیاه زراعی کشت شد. منشا آن به درستی معلوم نیست احتمال می رود رویشگاه نخست آن مکزیک و جنوب خاوری آمریکای شمالی باشد (عرشی، 1373). در قرن 19 نیز این گیاه از اروپا به روسیه انتقال یافته و سطح زیر کشت آن در روسیه به شدت افزایش یافت. دانشمندان روسی تلاش‌های زیادی در جهت اصلاح و افزایش روغن این گیاه انجام دادند به همین دلیل بیشتر ارقام تجاری، مربوط به این کشور می باشد. هم‌اکنون آفتابگردان یکی از چهار گیاه روغنی مهم جهان می باشد و کشت آفتابگردان در ایران به عنوان دانه‌ی روغنی از سال 1346 آغاز گردیده است (ناصری، 1370).

1-2- ژنتیک آفتابگردان

آفتابگردان گیاهی دگربارور می‌باشد. دارای انواع گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید بوده و در جنس هلیانتوس n=17 می باشد. این گیاه دارای خودناسازگاری اسپوروفیتی است. البته با خویش‌آمیزی ژنوتیپ‌های 100٪ بارور تولید می‌شود (عرشی، 1373). ارقام مصنوعی از اینبردهایی که هر یک در

[1-A]steracea

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مجموع قابلیت ترکیب خوبی باهم دارند به وجود می‌آیند. عملکرد و درصد روغن این ارقام نسبت به ارقام بومی تجاری بیشتر است. ارقام هیبرید بسیار پرمحصول بوده و از لحاظ بوته یکنواخت‌تر هستند، همچنین درصد روغن بیشتری نسبت به ارقام دیگر دارند. ارقام تجاری بومی که عملکرد پایین‌تری نسبت به بقیه ارقام دارند از یکنواختی نامطلوب‌تری برخوردارند (آلیاری و همکاران، 1379).

1-3- گیاهشناسی آفتابگردان

آفتابگردان، با نام علمی *Helianthus annus* L. گیاهی است یکساله با ریشه‌ی عمودی مقاوم که به علت طویل بودن ریشه رطوبت اعماق را جذب نموده و می‌تواند تا حدی در مقابل خشکی و گرما مقاومت نماید. علاوه بر ریشه‌ی اصلی که تا عمق 2 متر در زمین فرو می رود، این گیاه 2 نوع ریشه دیگر نیز دارا می‌باشد. ریشه‌های فرعی که تا 25 سانتیمتری خاک پراکنده شده و مهمترین قسمت ریشه را تشکیل می‌دهند. ریشه‌های سطحی که نزدیک به سطح خاک پراکنده می‌شوند. به طور کلی این گیاه می تواند آب را از عمق 150 سانتیمتری خاک جذب کند و به همین علت در مناطقی با شرایط آب و هوایی خشک بطور وسیع کشت می‌شود. ساقه‌ی آفتابگردان ستبر، مقطع آن گرد و قطر آن از 1 تا 10 سانتیمتر متفاوت بوده و پوشیده از کرک‌های خشن است. در آفتابگردان های زراعی معمولا ساقه بدون شاخه می باشد و از انواع چند شاخه به عنوان والد نر در تولید بذر هیبرید استفاده می شود. با توجه به همبستگی مثبت ارتفاع گیاه و عملکرد دانه، کاهش رشد ساقه باعث کاهش عملکرد خواهد شد. برگها بزرگ و قلبی شکل، متناوب و کرکدار می باشند (پور صالح، 1374). این گیاه دارای طبق دایره‌ای شکل یا گل آذین کپه‌ای در انتهای ساقه می باشد هر طبق می تواند 1000 تا 4000 گلچه داشته باشد. گل-های گل آذین دو نوعند گلچه‌های بیرونی عقیم و زرد رنگ و گلچه‌های درونی ارغوانی و بارور می شوند. باز شدن گل‌ها از پیرامون طبق به طرف مرکز آن صورت می گیرد. میوه آفتابگردان فندقه می‌باشد

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(ناصری، 1370). این گیاه به نور فراوان نیازمند است در صورت عدم دریافت نور کافی دچار کاهش عملکرد بسیار شدیدی خواهد شد (عرشی، 1373). شدت نور در سنتز اسیدهای چرب نقش مهمی دارد افزایش نور میزان اسیدهای چرب اشباع را افزایش می‌دهد (آلیاری و همکاران، 1379). این گیاه نسبت به طول روز بی تفاوت می باشد. طول دوره رشد آفتابگردان بسته به رقم و کلیه عوامل محیطی از 90 تا 150 روز می‌باشد (عرشی، 1373).

1-4-اهمیت آفتابگردان

گیاه آفتابگردان مصارف خوراکی، دارویی و صنعتی بسیاری داشته و از این جهت در بین گیاهان روغنی جایگاه ویژه‌ای دارد. از آنجایی که عمده ارزش غذایی واقتصادی این گیاه در بذور آن نهفته است و بذور منبع اصلی برای پروتئین، کربوهیدرات و روغن می‌باشند، اصلاح ژنتیکی در راستای بهبود کیفیت و کمیت مرتبط با دانه آفتابگردان اهمیت پیدا کرده است. دو نوع مصرف عمده دانه در این گیاه بصورت آجیل و روغن است. انواع آجیلی ، دانه درشت‌تر و پوسته کلفت‌تری نسبت به انواع روغنی دارند. دانه‌ی آفتابگردان از لحاظ ارزش غذایی بسیار مقوی بوده و حاوی 24٪ پروتئین، 47٪ روغن، 20٪ مواد هیدروکربنه، 8٪ فسفر، 9٪ پتاسیم و همچنین دارای مقادیر قابل توجهی از ویتامین-های A و B و E می باشد . روغن آفتابگردان که از تخم آن استحصال می شود برای پخت و پز و تهیه ی انواع سالاد استفاده می شود و ارزان‌تر از فراورده‌های زیتون می باشد و به علت غیراشباع بودن اسیدهای چرب آن باعث کاهش چربی خون شده و کلسترول خون را تنظیم می کند. کنجاله ی باقیمانده پس از استحصال روغن نیز به مصرف دام می رسد (آلیاری و همکاران، 1379).

گل، برگ، ساقه، ریشه و تخم آفتابگردان دارای ارزش دارویی می باشد و از قدیم الایام مورد استفاده ی بشر قرار گرفته است از جمله: از گل برای التیام زخم‌ها، پایین آوردن فشارخون، سرگیجه، ودرمان

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

آرتروز ازبرگ‌ها برای تقویت معده. از ریشه برای درمان فتق وبیماری‌های دستگاه گوارشی و از تخم آن برای درمان سردردها و همچنین اسهال خونی استفاده می شود (عرشی، 1373). ساقه‌ی آفتابگردان فیبر زیادی داشته و در صنعت کاغذسازی و تهیه‌ی سلولز استفاده می شود. ساقه از لحاظ نیتروژن، Ca، K غنی است و اضافه نمودن آن به خاک سبب افزایش ماده آلی و حاصلخیزی خاک می شود. از جمله مصارف صنعتی دیگر تولید کائوچو است. کائوچو از مواد اصلی کارخانه‌های لاستیک سازی است، تهیه کائوچوی خام هزینه‌ی زیادی برای کارخانجات لاستیک سازی می طلبد. در حال حاضر تولید کائوچوی طبیعی عمدتا در انحصار کشورهای شرق آسیاست و کشورهای صنعتی مثل امریکا برای دستیابی به منابع جدید تولید کائوچو به گیاه آفتابگردان علاقه نشان می‌دهند. بطوریکه در این کشورها تحقیقات موثری در راستای اصلاح ژنتیکی و بهره‌برداری از این گیاه جهت تولید کائوچو در حال انجام است (آلیاری و همکاران، 1379).

1-5- اهمیت بذر

استفاده از گیاهان جهت تولید پروتئین‌های با ارزش صنعتی و دارویی تحت عنوان کشت مولکولی[6] مطرح می شود. تولید این پروتئین‌ها می تواند در قسمت‌های مختلف گیاه مثل برگ‌ها، غده‌ها و ارگان-های ذخیره‌ای، میوه‌ها و بذور انجام بگیرد. تولید موفق پروتئین‌های نوترکیب در گیاه با چند فاکتور مشخص می شود: شدت بیان ژن، پایداری پروتئین تولید شده، تا خوردن صحیح پلی‌پپتید تولید شده، خالص سازی و بازیافت پروتئین تولید شده. بنا به دلایل زیر بذور میزبان مناسبی برای تولید پروتئین-های نوترکیب می باشند:

1- پروتئین‌های نوترکیب در بذور می‌توانند به مدت طولانی و با کیفیت بالا ذخیره شوند.

1- Molecular farming

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2- در تولید پروتئین‌های دارویی نیاز به تولید استریل این پروتئین‌ها می‌باشد که بذور محل مناسبی برای اینکار استز در حالی که برگها، غده‌ها و میوه‌ها با آلودگی بیشتری مواجه می‌شوند.

3- بیان بالا و همچنین قابلیت تنظیم سطح بیان ژن خارجی در بذور. بذور محل انباشت پروتئین-های ذخیره‌ای می باشند و این پروتئین‌ها در مقادیر بالا در بذور ذخیره می‌شوند. ژن‌های این پروتئین‌ها دارای راه‌اندازهای بسیار قوی هستند با استفاده از این راه‌اندازها می‌توان سطح بیان ژن خارجی را در بذر تنظیم نمود.

4- خالص سازی و بازیافت پروتئین‌های نوترکیب از بذور راحت تر است.

در استفاده از بذور به عنوان میزبان، بیشتر مطالعات روی پروتئین‌های ذخیره‌ای متمرکز شده است (بلک و همکاران، 2000). ساختار ژنهای کد کننده ی پروتئین‌های ذخیره‌ای گیاهان تک‌لپه و دولپه مطالعه شده است از آنجا که این پروتئین‌ها در غلظت بالا در بذور ذخیره می‌شوند، دارای راه‌اندازهای بسیار فعالی می باشند که می‌توان از این راه‌اندازها برای بیان ژن‌های خارجی در بذور استفاده نمود (جوردانو وهمکاران، 1989).

1-5-1- بذور خزانه‌های طبیعی انباشت پروتئین

بذور علاوه بر اینکه وسیله تکثیر و تداوم نسل گیاه هستند، منبع ذخیره مواد متنوعی نیز می‌باشند. بذور گیاهان، لیپید و کربوهیدرات را به عنوان منبع کربن و مجموعه‌ای از پروتئین‌ها را به عنوان منبع نیتروژن و سولفور ذخیره می‌کنند (سورگان و همکاران، 1999). توانایی ذخیره چنین موادی در بذور، تکثیر گیاه را تحت شرایط دشوار و تنش‌های مختلف تضمین می‌کند. ذخیره‌ی پروتئین‌ها در بافت‌های خاصی نظیر کوتیلدون، پریسپرم و آندوسپرم انجام می‌گیرد (بلک و همکاران، 2000).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر شامل آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها (پروتئین‌های ذخیره‌ای دو لپه‌ها) پرولامین‌ها و گلوتنین‌ها (پروتئین‌های ذخیره‌ای تک لپه‌ها) می باشند (ماندال، 2000). این پروتئین‌ها از لحاظ توالی آمینواسیدی و وزن مولکولی متفاوت می‌باشند ولی همه آنها دنباله‌های سیستئین محافظت شده دارند (اگرو وهمکاران، 1996). وجه تمایز پروتئین‌های ذخیره‌ای از سایر پروتئین‌های گیاهی این است که پروتئین‌های ذخیره‌ای در مقادیر بالا در بذور ذخیره شده و در طی جوانه زنی مصرف می شوند همچنین سنتز این پروتئین‌ها در بذور و نه در بافت‌های دیگر انجام می‌گیرد (ماندال، 2000).

1-6- پروتئین ذخیره‌ای آلبومین

بذور آفتابگردان دارای دو پروتئین ذخیره‌ای بسیار مهم می‌باشند. 11S گلوبولین یا هلیانتینین (محلول در NaCl) و 2S آلبومین (محلول در آب) آلبومین S 2 50٪ از مجموع پروتئین‌های بذری را به خود اختصاص می‌دهد (گوگن وهمکاران، 1996). آلبومین2S، پروتئینی با وزن مولکولی کم می‌باشند که در کوتیلدون‌های گیاهان دولپه سنتز و ذخیره می‌شود دارای دنباله‌های سیستئین حفاظت شده و حاوی نیتروژن و سولفور فراوان می‌باشند و از این جهت نقش بسیار مهمی در تغذیه انسان و دام دارند (ماندال، 2000). آلبومین2S در بیشتر گیاهان نظیر بادام زمینی برزیلی[7] و کلزا[8] دارای دو زنجیره‌ی پلی پپتیدی می‌باشد که هر دو زنجیره از یک mRNA سنتز می‌شوند. این دو زنجیره پلی‌پپتیدی بوسیله باندهای دی سولفید بهم دیگر متصل می‌شوند. اما در آفتابگردان آلبومین2S یک زنجیره پلی‌پپتیدی دارد. تک زنجیره و یا چند زنجیره بودن مربوط به تغییرات پس از ترجمه می باشد (گوگن وهمکاران، 1996). در گیاه آفتابگردان این پروتئین بوسیله ژن *hag5* رمز می شود. این ژن دارای یک اینترون می‌باشد توالی این ژن

1- Brazil nut
2- Rape

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

همولوژی زیادی با ژن *napin* در *Brassica* و سایر پروتئین‌های بذری در سوپر خانواده آلبومین نشان داده است (آلن و همکاران، 1987).

mRNA آلبومین 5 روز بعد از باروری تولید می‌شود پلی‌پپتیدهای آلبومین 5 روز بعد از باروری، و 2روز قبل از ایجاد هلیانتینین در جنین قابل تشخیص می‌باشند این پلی پپتیدها تا زمان بلوغ در بذور حضور دارند. پروتئین آلبومین به سرعت در جنین ذخیره می‌گردد تا به حداکثر مقدار خود برسد که این زمان مصادف با 12 تا 15 روز بعد از باروری می باشد بعد از این مدت رونوشت‌های آلبومین کاهش می‌یابد. mRNA آلبومین در بذور خشک، بذور جوانه زده و برگها غیر قابل تشخیص است. پلی‌پپتید آلبومین 295 آمینواسید دارد و حاوی آمینواسیدهای هیدروفوبیک انتهایی می‌باشد این پلی پپتید دچار فرایندهای پروتئولیتیک می‌شود و این دنباله حذف می‌شود بطوری که وزن مولکولی پروتئین غیر بالغ 38 کیلو دالتون و وزن مولکولی پروتئین بالغ 17/7 کیلو دالتون می‌باشد. پروتئین بالغ 25٪ گلوتامین و 6/7٪ سیستئین دارد (آلن و همکاران، 1987).

برخی از پروتئین‌های آلبومین 2S غنی از گلوتامین فعالیت فعالیت آنتی میکوتیک [9] و آنتی‌باکتریال[10] نشان داده‌اند این پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت علیه بیماری‌های گیاهی بوسیله‌ی استراتژی‌های انتقال ژن بسیار مفید می‌باشند (ژیجیان و همکاران، 2005). از جمله میتوان به آلبومین 2S ترپچه و خردل روغنی اشاره کرد که فعالیت علیه قارچ‌های بیماری‌زا نشان داده‌اند (آنیسیموا و همکاران، 1995).

1- Antmycotic
2-Antibacterial

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-7- راه‌انداز یا پیش بر[11]

راه‌انداز به قسمتی از توالی DNA گفته می شود که آنزیم RNA پلی مراز آنرا برای شروع رونویسی شناسایی و بدان متصل می گردد. معمولا راه‌اندازها در بالادست ژن‌ها قرار دارند. راه‌اندازهای یوکاریوتی بسیار متنوعند و طولشان می تواند به چندین کیلوباز نیز برسد و حدود 10 تا 20 درصد طول یک ژن را شامل می شوند. در باکتریها راه‌انداز بوسیله عامل سیگمای آنزیم RNA پلی مراز تشخیص داده می شود. در یوکاریوت‌ها این فرایند پیچیده‌تر بوده و حداقل به 7 فاکتور مختلف برای اتصال RNA پلی مراز به راه‌انداز نیاز می باشد (براون، 2002).

اجزاء راه‌انداز از یک ژن به ژن دیگر متغیر می باشد ولی همگی از طریق توالی‌های مورد توافق[12] با همدیگر ارتباط پیدا می کنند. مانند جعبه TATA در یوکاریوت‌ها، که در موقعیت 25- واقع شده و یا توالی‌های 10- (پریبنو) و 35- در پروکاریوت‌ها (یزدی‌صمدی و ولی زاده، 1380). یک راه‌انداز شامل قسمت های زیر می باشد:

- هسته اصلی[13] که شامل محل آغاز نسخه‌برداری[14] و محل اتصال RNA پلی مراز است.
- محل اتصال فاکتورهای رونویسی. مثلا توالی تنظیمی E-box محل اتصال فاکتورهای خانواده bHLH[15] می باشد. الگوریتم‌های زیادی برای تشخیص راه‌اندازها وجود دارد و از همان روش‌های پیشگویی ژن برای پیشگویی راه‌انداز استفاده می‌شود (میتسوهارا و همکاران، 1996).

1-Promoter

2- Consensus sequences
3-Core promoter
4-Transcriptional start site
5- Basic-helix-loop-helix

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1-8- اهمیت راه‌اندازها

توالی راه‌انداز بالادست ژن‌ها بسیار مهم است زیرا کارایی آنزیم RNA پلی‌مراز در استقرار و چسبیدن به راه‌انداز و در نتیجه نحوه تظاهر ژن را تحت تاثیر قرار می دهد. مقدار فراورده ژنی به میل ترکیبی نسبی آنزیمRNA پلی مراز با راه‌انداز بستگی دارد. تغییرات جزئی معینی در راه‌انداز می‌تواند مانع عمل تشخیص بوسیله آنزیم RNA پلی‌مراز گردد(براون، 2002). برخی از بیولوژیست‌های تکامل نظیر آلن ویلسون معتقدند که تکامل راه‌انداز یا نواحی تنظیمی بسیار مهم‌تر از تغییر در نواحی کد کننده است. هنگامی که سلول یک محرک فیزیولوژیکی، پاتولوژیکی و یا دارویی را دریافت می‌کند تعدادی از پروتئین‌های سلولی از لحاظ شیمیایی و از طریق آبشار علامتی تغییر می‌کنند. با تغییر در ساختار، پروتئین‌های خاص قادر خواهند بود که وارد هسته سلولی شده و به راه‌انداز یا به پروتئین‌های دیگری که آنها نیز به راه‌اندازها متصل می‌شوند، اتصال یابند. کمپلکس چند پروتیئنی تشکیل شده قادر به تغییر سطح بیان ژن خواهد بود و در نتیجه فراورده آن ژن در سلول افزایش یا کاهش می یابد. دلایلی وجود دارند مبنی بر اینکه تعدادی از بیماری‌ها از درست عمل نکردن راه‌اندازها ناشی می شوند این بیماری‌ها در 3 حالت رخ می دهند: وقوع جهش در توالی راه‌انداز، وقوع جهش در ژن‌های کد کننده فاکتور های رونویسی، وقوع جهش در ژن‌های کد کننده Co-activator های رونویسی. بسیاری از سرطان‌ها در نتیجه تغییرات در نواحی تنظیمی رونویسی ژن‌ها ناشی می‌شوند (یوشی‌هارو و همکاران، 2007).

1-9- تقسیم بندی راه‌اندازها

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

راه‌اندازها به طور کلی به 2 گروه تقسیم می شوند: راه‌اندازهای ساختاری (دائمی) و راه‌اندازهای اختصاصی (پوتینزا و همکاران، 2003).

راه‌اندازهای ساختاری (دائمی) بطور پیوسته ژن‌های پایین دست خود را در کل دوره زندگی گیاه و در تمامی بافت‌های گیاه بیان می‌کنند. در مقابل راه‌اندازهای اختصاصی سبب بیان ژن‌های پایین دست خود در بافت و یا اندام اختصاصی می شوند. وجود این راه‌اندازها باعث می‌شود که این ژن‌ها در دیگر بافت-ها بیان نشده و یا بیان بسیار کمی داشته باشند (کینگل و همکاران، 2007).

1-9-1- راه‌اندازهای ساختاری [16]

راه‌اندازهای ساختاری مورد استفاده در مهندسی ژنتیک از دو منبع ویروسی و گیاهی به دست آمده-اند. از جمله راه‌اندازهای ساختاری با منشا ویروسی CaMV35S[17] می باشد این راه‌انداز سبب بیان بالای ژن‌ها در گیاهان تک لپه و دولپه می گردد (باتاراو و همکاران، 1990). از سایر راه‌اندازهای ساختاری با منشا ویروسی می توان به راه‌اندازهای CsVMV، BSV، MMV، FMV اشاره نمود (پوتینزا و همکاران، 2003). از راه‌اندازهای ساختاری با منشا گیاهی می توان راه اندازهای ژن‌های اکتین و یوبی کوئیتین را نام برد. اکتین ترکیب اصلی سیتواسکلتون است که در تمام سلول‌های گیاهی بیان می‌شود. راه‌انداز Act2 از خانواده ژنی اکتین در گیاه آرابیدوپسیس بدست می‌آید (آن و همکاران، 1996). یوبی کوئیتین یک پروتئین بسیار حفاظت شده است که در بسیاری از فرایندهای حیاتی سلول از جمله تغییر و تبدیلات پروتئین، ساختار کروماتین، و تعمیر DNA شرکت دارد. این پروتئین در سیتوپلاسم سلول‌های

1-Constitutive Promoters
2-Cauliflower mosaic virus

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com