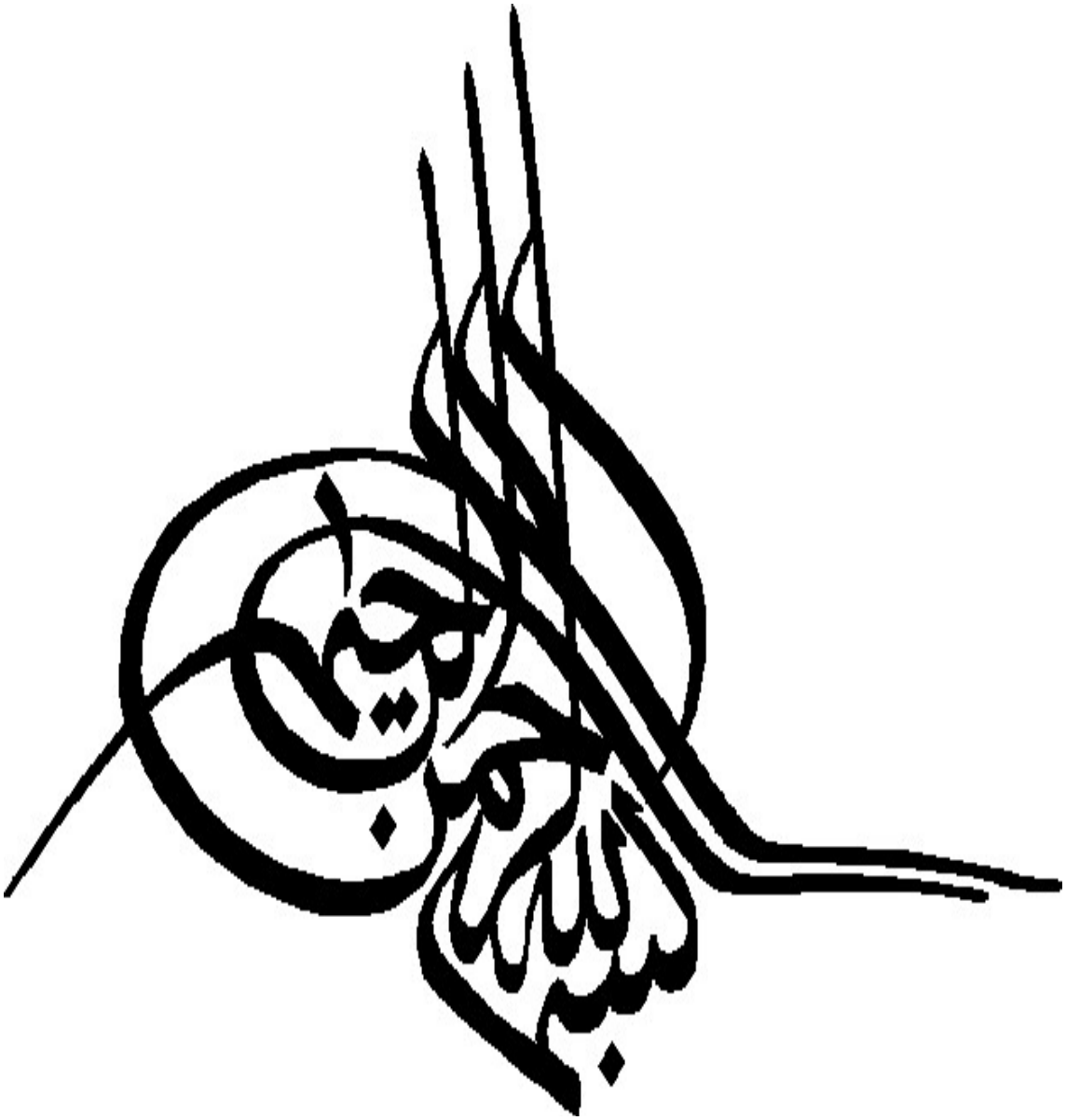
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

مرکز تهران شرق

پایان نامه

برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

گروه کشاورزی

عنوان پایان نامه:

شناسایی نشانگر اختصاصی مرتبط با ژن مسئول تولید اسیدآمینه لیزین در باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* با استفاده از تکنیک مولکولی STS

سیده حمیده نورالدینی

اساتید راهنما:
دکتر پروین شورنگ
دکتر محمدطاهر حلاجیان

استاد مشاور:

دکتر غلامرضا بخشی خانیکی

اسفند ۱۳۹۰

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم تحقیقات و فناوری

مجتمع علوم پایه و کشاورزی

شماره .....
تاریخ .....
پیوست .....

دانشگاه پیام نور
دانشگاه پیام نور استان تهران
اللهم جمل لوديک المرتع والعافية والنصر

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

جلسه دفاع ازپایان نامه کارشناسی ارشد خانم سیده حمیده نورالدینی

دانشجوی مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی به شماره دانشجویی

۸۸۰۳۲۲۵۹۰

تحت عنوان:

" شناسایی نشانگر اختصاصی مرتبط با ژن مسئول تولید اسید آمینه لیزین در باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با استفاده از تکنیک مولکولی STS "

جلسه دفاع با حضور داوران نامبرده ذیل در روز شنبه مورخ: ۹۰/۱۲/۰۶ ساعت: ۱۲-۱۱

در محل مرکز تهران شرق برگزار شد. پس از بررسی پایان‌نامه مذکور با نمره به عدد ۱۹.۶ .....

به حروف نوزده و شش دهم و با درجه ارزشیابی عالی .....مورد قبول واقع شد ☑ نشد ☐

هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه/ موسسه	امضاء
استاد راهنما	دکتر پروین شورنگ	استادیار	علوم و فنون هسته ای	
استاد راهنمای همکار	مهندس محمدطاهر حلاجیان	مدرس مدعو	علوم و فنون هسته ای	
استاد مشاور	دکتر غلامرضا بخشی خانیکی	استاد	پیام نور	
استاد داور	دکتر محمد علی ابراهیمی	استادیار	پیام نور	
نماینده گروه/نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد علی ابراهیمی	استادیار	پیام نور	

تهران، خیابان استاد نجات اللهی
خیابان شهید فلاح پور، پلاک ۲۷
تلفن: ۸۸۸۰۰۲۵۲
دورنگار: ۸۸۳۱۹۴۷۵
WWW.TPNU.AC.IR
science.agri@tpnu.ac.ir

اینجانب سیده حمیده نورالدینی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می‌نمایم چنانچه در پایان‌نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته‌ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده‌ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش خویش می‌دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید می‌نماید که مطالب مندرج در این پایان‌نامه نتیجه تحقیق خودش می باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را دکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجو سیده حمیده نورالدینی

تاریخ و امضاء ۹۱/۳/۷

اینجانب سیده حمیده نورالدینی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می‌نمایم چنانچه بر اساس مطالب پایان‌نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، و...و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو سیده حمیده نورالدینی

تاریخ و امضاء ۹۱/۳/۷

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

اسفند ۱۳۹۰

تقدیم به:

روح پاک پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم

و به مادرم، دریای بی‌کران فداکاری و مهربانی

و به خواهران و برادران عزیزم

تشکّر و قدردانی

با سپاس فراوان از اساتید ارجمندم خانم دکتر پروین شورنگ، آقای دکتر محمدطاهر حلاجیان، آقای دکتر غلامرضا بخشی خانیکی و آقای دکتر محمد علی ابراهیمی داور محترم پایان‌نامه؛ بدیهی است چنانچه لطف، محبّت و راهنمایی‌های بی‌دریغ این بزرگواران، مشوق و پشتوانه حرکتم نبود به طورحتم موفّقیتی برای این‌حقیر حاصل نمی‌شد؛ امیدوارم این عزیزان قصور زبان و قلم بنده را در سپاس از الطاف و زحماتشان به دیده اغماض بنگرند.

از مسئولین و پرسنل محترم پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت اجرای مطلوب این پایان نامه تشکر می‌نمایم.

از تمامی معلّمان و استادان گرانقدرم، به پاس زحمات بی‌دریغشان در طی سال‌های دوران تحصیل، که در تمامی مراحل زندگی و تحصیل همواره یار، همراه و پشتیبانم بوده‌اند و نیز زحمات دوستان بزرگوارم که هر یک به نحوی در انجام و اتمام پایان‌نامه بنده را یاری نموده‌اند خانم ها حمیده افشارمنش، سلماز یزدان پناه، فرنگیس امیرلو، مریم پاکدل و آقایان حامد زرگران، حسن وطن خواه، سید محمد هادی رضوی، داوود گلی و دیگر دوستانی که آوردن نامشان در این مجال نمی‌گنجد، کمال سپاس را داشته و برای تمامی این عزیزان سلامت، سعادت و سربلندی از خداوند منّان آرزومندم.

سیده حمیده نورالدینی

چکیده

اسیدآمینه ال-لیزین یکی از اسیدآمینه های ضروری برای دام و طیور می‌باشد، بـه همـین دلیـل در تغذیه استفاده از آن به عنوان یک مکمل غذایی از اهمیـت ویـژه‌ای برخـوردار اسـت. امـروزه شـیوه متداول تولید لیزین، استفاده از میکروارگانیسم‌ها بویژه باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* است. یکی از روش‌های مورد استفاده برای افزایش تولید این اسیدآمینه در کورینه بـاکتریوم گلوتـامیکوم ایجـاد جهش و انتخاب سویه‌های مناسب است.

در این تحقیق از باکتری *Corynebacterium glutamicum* PTCC NO.1532 اسـتفاده شـد. بعـد از تنظیم شرایط رشد و بهینه‌سازی محیط کشت این باکتری، جداسازی و تعیین کیفیت و کمیـت DNA انجام شد. برای شناسایی نشانگرهای اختصاصی مرتبط بـا ژن‌هـای مـسئول تولیـد لیـزین و ارزیـابی مولکولی سویه‌های وحشی و موتانت با اشعه گاما، از واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز (PCR) و تکنیـک مولکولی STS استفاده شد. از ۱۲ ترکیب آغازگری مورد استفاده در این تحقیق ۱۱ ترکیب آغـازگری باند یا باندهایی در سویه‌هـای مـورد مطالعـه تکثیـر نمودنـد. ایـن ۱۱ جفـت آغـازگر، نـشانگرهای اختصاصی مرتبط با ژن‌های مسئول تولید لیزین در این باکتری را ایجاد نمودنـد. داده‌هـای مولکـولی حاصل از این تحقیق نشان داد که هیچ تفاوتی بین سویه‌های موتانت و وحشی وجود نداشـته اسـت. این مسئله حاکی از آن است که جهش‌های حذف یا بیشبود در نواحی مرتبط با افزایش تولیـد لیـزین در نواحی غیر از توالی‌های مکمل با آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق رخ داده است.

واژگان کلیدی: نشانگرهای اختصاصی، ژن‌های مسئول تولید اسیدآمینه لیزین، باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تکنیک مولکولی STS.

فهرست مطالب

عنوان .. ..صفحه

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ هدف ۵

فصل دوم: مبانی نظری و پیشینه تحقیق

۲-۱ اهمیت تولید لیزین ۸

۲-۲ میکروارگانیسم‌های تولید کننده لیزین ۱۰

۲-۳ تاریخچه تولید لیزین به وسیله *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ... .۱۱

۲-٤ مسیر سنتز لیزین در *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ۱۲

۲-۵ بهینه کردن تولید لیزین ۱٦

۲-٦ جهش ۱۷

۲-٦-۱ عوامل جهش‌زای شیمیایی.....۱۸

۲-٦-۲ جهش‌های حاصل از پرتوها... .....۱۹

۲-٦-۲-۱ پرتوهای فرابنفش ۱۹

۲-٦-۲-۲ پرتوهای گاما و ایکس.....۱۹

۲-٦-۳ جهش و بهبود تولید لیزین در *کورینه باکتریوم* گلوتامیکوم.....۲۰

۲-۷ خصوصیات *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ۲۱

۲-۷-۱ کاربرد *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در بیوتکنولوژی ۲٤

۲-۸ نشانگرها ۲۵

۲-۸-۱ نشانگرهای مورفولوژیک ۲۵

۲-۸-۲ نشانگرهای مولکولی ۲٦

۲-۸-۲-۱ نشانگرهای پروتئینی ۲٦

۲-۸-۲-۲ نشانگرهای مولکولی DNA و RNA ۲۷

۲-۸-۲-۲-۱ نشانگرهای مولکولی غیرمبتنی بر PCR ۲۸

۲-۸-۲-۲-۲ نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR ۲۸

۲-۸-۲-۲-۲-۱ نشانگرهای STS ۲۹

۲-۹ توالی‌یابی ژنوم *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ۳۱

فصل سوم: روش تحقیق

۳-۱ محیط کشت باکتری ۳۵

۳-۱-۱ نحوه آماده‌سازی محیط کشت نوترینت آگار ۳۵

۳-۱-۲ نحوه آماده‌سازی محیط کشت TSB ۳٦

۳-۲ رنگ آمیزی باکتری‌ها ۳۷

۳-۳ محیط تولید لیزین ۳۸

۳-٤ سنجش مقدار لیزین تولید شده ۳۹

۳-۵ استخراج DNA از *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ٤۰

۳-۵-۱ روش استخراج ٤۱

۳-٦ تعیین کیفیت و کمیت DNA ٤۲

۳-٦-۱ اسپکتروفتومتری ٤۲

۳-٦-۲ الکتروفورز ژل ٤۳

۳-۷ انجام واکنش PCR ٤۳

۳-۷-۱ ترکیب و غلظت مواد مورد استفاده در PCR ٤۳

۳-۷-۲ توالی آغازگرها ٤۵

۳-۷-۳ روش کار PCR ٤۷

۳-۷-٤ الکتروفورز فرآورده‌های تکثیری ٤۹

فصل چهارم: یافته‌های تحقیق

٤-۱ نتیجه تهیه کشت تازه از باکتری ۵۳

٤-۲ آزمایشات اسپکترومتری و انتخاب سویه‌های پرتوتابی شده با مقدار لیزین بالا ۵٤

٤-۳ بهینه کردن دمای اتصال آغازگر ۵۵

٤-٤ بررسی مولکولی سویه‌های موتانت و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* به‌وسیله آغازگرهای اختصاصی با استفاده از تکنیک STS ۵۷

فصل پنجم: جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

۵-۱ نتیجه‌گیری کلی ۶۷

۵-۲ پیشنهاد ۷۰

منابع مورد استفاده ۷۱

چکیده انگلیسی ۷۹

فهرست جداول

جدول ۳-۱ ترکیبات آغازگری و توالی آن‌ها ٤٥

جدول ۳-۲ ژن‌های مورد بررسی و فرآورده آن‌ها ٤٦

جدول ۳-۳ مواد مورد استفاده در فرآیند PCR ٤٨

جدول ۳-٤ برنامه حرارتی فرآیند PCR ٤٩

جدول ۳-٥ ترکیبات مورد استفاده در ساخت بافرTAE ٥٠

جدول ٤-۱ میانگین غلظت اسید آمینه لیزین تولید شده قبل و بعد از پرتوتابی ٥٥

جدول ٤-۲ دمای اتصال آغازگرها ٥٦

فهرست اشکال

شکل۲-۱ مسیر سنتز لیزین در *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* ۱٥

شکل۲-۲ *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ۲۲

شکل۳-۱ اسلاید رنگ آمیزی شده *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ۳۸

شکل ۳-۲ تصویر لدرهای مورد استفاده : به ترتیب از راست به چپ لدر Mix، لدر bp ۱۰۰ و لدر۱kb.....٥۱

شکل ٤-۱ کشت باکتری بر روی محیط کشت نوترینت آگار ٥٤

شکل ٤-۲ نمودار استاندارد لیزین (نمودار جذب در برابر غلظت‌های مختلف لیزین خالص).....٥٤

شکل ٤-۳ اثر پرتوتابی بر غلظت اسیدآمینه لیزین تولید شده ٥٤

شکل٤-٤ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* (w)حاصل از آغازگر lysC-F و lysC-R ۵۸

شکل ٤-۵ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگر lysA-F و lysA-R ۵۸

شکل ٤-٦ الگوهای باندی گرادیانت با آغازگر lysE-F و lysE-R ۵۹

شکل ٤-۷ الگوهای باندی سویه‌های موتانت (شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی کورینه باکتریوم گلوتامیکوم حاصل از آغازگر leuC-R و leuC-F ٦۰

شکل ٤-۸ الگوهای باندی سویه‌های موتانت (شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی کورینه باکتریوم گلوتامیکوم حاصل از آغازگرهای leuA1 ،leuA2-2 .....٦۰

شکل ٤-۹ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگرهای leuA4 ،leuA3-2 .....٦۱

شکل ٤-۱۰ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگرهای leuA4، leuA2-2 .....٦۱

شکل ٤-۱۱ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگرهای leuA3-1 ،leuA2-2 .....٦۲

شکل ٤-۱۲ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگرهای 0855f2 و 0855r.....٦۳

شکل ٤-۱۳ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگرهای AmtA ocd-soxA-f2، AmtA-ocd-soxA-r ٦۳

شکل ٤-١٤ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگرهای 1500-01f1 و 1500-01r ٦٤

شکل ٤-١٥ الگوهای باندی سویه‌های موتانت(شماره ۱۱۳،۱۱۵،۲٤۳) و سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از آغازگرهای 1506-07f2 و 1506-07r.....٦٥

فصل اول

کلیات تحقیق

۱-۱ مقدمه

اصطلاح بیوتکنولوژی در سال ۱۹۱۷ بوسیله یک مهندس مجارستانی به نام کارل ایرایکی [1] در موردچغندرقند برای تغذیه خوک‌ها بکار برده شد. در مفهوم کلی، تعریف بیوتکنولوژی یعنی تولید فرآورده‌های تجارتی حاصل از عمل متابولیکی میکروارگانیسم‌ها می باشد. بدین ترتیب، دورنمای تاریخی بیوتکنولوژی به زمان اولین سازندگان حرفه‌ای برمی‌گردد که مخمر را برای تخمیر آبجو به کار بردند و یا سازندگان ماست که باکتری را برای ساختن ماست مورد استفاده قرار دادند.

علیرغم اینکه از تولد علم بیوتکنولوژی به مفهوم کنونی آن دیر زمانی نمی‌گذرد بکارگیری میکروارگانیسم‌ها برای اهداف صنعتی در سطح وسیع تازگی چندانی نداشته و قدمتی طولانی دارد. بیوتکنولوژی در اکثر موارد، میکروارگانیسم‌ها را در توده‌ای انبوه برای تولید فرآورده‌های تجارتی مورد استفاده قرار می‌دهد.

باکتری‌ها مدتها است که به عنوان یک ابزار بسیار مناسب برای مطالعات مختلف خصوصاً در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند به طوری که کشف بسیاری از فرایندها وسازوکارهایی که در سلول اتفاق می‌افتد در اثر تحقیقاتی بوده است که بر روی این موجودات انجام شده است. ساده و کم هزینه بودن کشت این گروه از میکروارگانیسم‌ها به همراه مدت زمان کوتاهی که برای رشد آنها لازم است سبب شده است تا روش‌های نوینی در مطالعات سلولی و مولکولی با استفاده از باکتری‌ها ابداع گردد. امروزه پیشرفت‌های شگرفی در زمینه دستکاری‌های ژنتیکی صورت گرفته است که نتیجه آن در بخش‌های مختلف صنایع داروسازی، پزشکی و محیط زیست نمایان گردیده و هر روز نیز به این دانش افزوده می‌گردد.

[1] Karl Eriky

باکتری‌های متعلق به جنس *کورینه باکتریوم*[1] به علت توانایی‌شان برای تولید و ترشح تعدادی از اسید آمینه‌های مهم صنعتی و نوکلئوتیدها، در پروسه‌های تولید صنعتی به ویژه برای تولید مقدار زیاد اسید آمینه‌های گلوتامات و لیزین مورد استفاده قرار می‌گیرند(کجلد ۲۰۰۸).

لیزین دومین اسید آمینه مهم از لحاظ تولید صنعتی و مصارف غذایی می‌باشد. محتوای لیزین در غلات به جز آرد دانه روغنی سویا بسیار کم می باشد لذا افزودن آن به غذای دام به منظور بالا بردن لیزین در غلاتی است که به مصرف دام می‌رسند، به همین دلیل تقاضا برای این اسیدآمینه در سال‌های اخیر به‌شدت افزایش یافته است. شرکت‌های زیادی در زمینه تولید اسیدهای آمینه به روش‌های شیمیایی و تخمیری فعالیت می‌کنند.

اسید آمینه‌های از جمله لیزین در موارد مختلفی همانند صنایع غذایی، تغذیه دام، داروها و... و همچنین به عنوان ماده اولیه در صنایع شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. لازم به یادآوری است که لیزین جزء اسید آمینه‌های ضروری در پستانداران می‌باشد لذا در داخل کشور نیز این اسید امینه به عنوان یک جز اصلی در مکمل‌های غذایی به غذای دام افزوده می‌شود که خرید آن همراه با صرف هزینه ارزی چشمگیری می‌باشد.

مقدار لیزین قابل تولید در میکروارگانیسم‌های طبیعی بسیار کم است و نمی‌توان با کشت و تکثیر آنها مکمل اسید آمینه مورد نیاز بازار را تأمین کرد. میکروارگانیسم‌های دارای توانایی تولید مقادیر زیاد لیزین با روش موتاسیون یا جهش تصادفی ایجاد می‌شوند و به صورت انحصاری در اختیار چند کشور قرار دارد (شاه[2]، ۱۹۹۸). بین شرکت‌های تولیدکننده اسیدآمینه رقابت وجود دارد و سویه‌های میکروبی مورد استفاده، روش‌های بیوتکنولوژی و نوع فرآیند تولید پیوسته تغییر می‌کند.

برنامه‌های بهینه‌سازی سویه در جهت تولید میکروارگانیسم‌هایی که از نظر اقتصادی حائز اهمیت هستند غالباً برای افزایش تولید یک محصول به کار برده می‌شوند. راه‌های مختلفی وجود دارد که طی

[1] *Corynebacterium*
[2] Shah

آن ساختار مواد ژنتیکی می‌تواند تغییر کند. اصول ژنتیک بر پایه استفاده از جهش‌های ساده (جهش-های نقطه‌ای) استوار است که در این نوع جهش DNA در یک نقطه دچار تغییر شده است.

اما بیشتر تنوعی که در باکتری‌ها (و دیگر موجودات) دیده می‌شود به علت تغییرات اساسی‌تری است که در ساختمان DNA ایجاد می‌گردد. ساده‌ترین این تغییرات حذف شدگی‌ها می‌باشد که در این حالت بخش عمده‌ای از یک ژن (یا حتی چند ژن) کاملاً محو می‌گردد (دال و پارک، ۱۳۸۸: ٦٤، ٦٧).

انواع دیگری از تغییرات در مقیاس بزرگ در تولید تنوع طبیعی میکروارگانیسم‌ها اهمیت دارند. زمانی که یک قطعه DNA خارجی وارد یک ژن می‌شود معمولاً آن ژن را غیر فعال خواهد کرد. علاوه بر تغییراتی که در ساختار DNA کروموزمی ایجاد می‌شود، تنوع در باکتری‌ها معمولاً به وسیله به دست آوردن (یا از دست دادن) DNA خارج کروموزمی اتفاق می‌افتد که این DNA خارج کروموزمی می-تواند یا به شکل پلاسمید باشد یا باکتریوفاژ(دال و پارک، ۱۳۸۸: ٦٨).

جهش‌ها در ابتدا به وسیله اثرات فنوتیپیکی آنها تشخیص داده می‌شود به این معنی که آنها بر ویژگی-های قابل مشاهده سلول تاثیر می‌گذارند. متاسفانه همیشه با مشاهده فنوتیپ نمی‌توان اطلاعات زیادی از ژنوتیپ به دست آورد؛ یعنی با مشاهده فنوتیپ نمی‌توان گفت که کدام ژن تحت تاثیر قرار گرفته است و اینکه چه نوع جهشی در آن ایجاد شده است.

معمولاً به راحتی می‌توان در DNA به طور تصادفی تغییر ایجاد کرد، اما هنر واقعی در طراحی ابزاری است که به آن وسیله بتوان جهش یافته‌ای را جدا نمود که در آن ژن‌های اختصاصی تغییر پیدا کرده-اند. در صورت امکان این عمل به طور مؤثر با استفاده از شرایط رشد انجام می‌پذیرد که در آن سویه اصلی یا جهش یافته قادر به رشد نمی‌باشد. گزینش روشی که به آن وسیله بتوان جهش یافته مورد نظر را انتخاب نمود بستگی به طبیعت جهش و نتایج حاصل از آن برای سلول دارد (دال و پارک ، ۱۳۸۸: ۸۷).

بعضی از روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، شناساگرهای ژنی، ساترن بلاتینگ و تعیین توالی DNA نیز در تشخیص انواع جهش یافته‌ها نقش دارند. نشانگرهای مولکولی

نیز ابزاری هستند که کارایی گزینش را در انتخاب لاین‌های جهش یافته برتر و تشخیص تنوع موجود بین لاین‌های جهش یافته را افزایش می‌دهند.

نشانگرهای مولکولی فراوان و در هر موجود زنده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه پتانسیل نشانگرهای مولکولی برای اصلاح کنندگان از حدود ۷۵ سال پیش شناخته شده بود، ولی کاربرد آنها تا حدود ۳۰ سال پیش به دلیل نبود نشانگرهای مناسب محدود بوده است. گسترش نشانگرهای DNA موجب به کارگیری روش‌های بسیاری برای غلبه بر مشکلات اصلاحی و ژنتیکی موجودات شده است. در سال‌های گذشته، از نشانگرهای DNA برای مطالعات پایه‌ای و کاربردی در انسان، حیوان و گیاه استفاده شده است. تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای DNA معرفی شده‌اند و در تجزیه‌های ژنتیکی موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند میزان چند شکلی، غالب یا همبارز بودن، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌یابی DNA الگو و هزینه مورد نیاز با همدیگر متفاوتند. بدون تردید، ابداع و معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. PCR یک روش سریع تکثیر آزمایشگاهی قطعه یا قطعات مورد نظر DNA است. هر نشانگری که مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز باشد و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مورد بررسی (معمولا بیش از۱۸ نوکلئوتید) ایجاد شود، یک جایگاه نشانمند در توالی نامیده می‌شود، زیرا پیش از طراحی آغازگر، بیگمان در یک مرحله، ردیف‌یابی صورت گرفته است(نقوی، ۱۳۸۸: ۵، ۷۳).

۱-۲ هدف

از آنجایی که L-لیزین یکی از اسید آمینه‌های ضروری است و کاربردهای بسیاری در صنایع مختلف دارد، در سال‌های اخیر تقاضا برای این اسید آمینه افزایش یافته و منجر به گسترش تحقیقات برای تولید صنعتی این اسیدآمینه شده است. گرچه در داخل کشور اقداماتی برای ایجاد جهش و افزایش تولید لیزین صورت گرفته است، تاکنون در زمینه شناسایی نشانگرهای اختصاصی مرتبط با ژن‌های مسئول تولید لیزین در باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم مطالعه‌ای انجام نشده است. هدف پژوهش

حاضر، شناسایی نشانگرهای اختصاصی مرتبط با ژنهای مسئول تولید اسیدآمینه لیزین در باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم با استفاده از تکنیک مولکولی STS می باشد.