بسم الله الرحمن الرحيم

بسم الله الرحمن الرحيم

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

مطالعه فعالیت ضد قارچی Defensin بیان شده در سیستم پروکاریوتی بر رشد برخی قارچ های بیماریزای گیاهی

نگارش

نادیا شافعی

استادان راهنما

دکتر مصطفی مطلبی دکتر محمد رضا زمانی

مهر ۹۰

حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

رساله جهت دریافت کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

بیان پروتئین Defensin گیاه تربچه (RS_AFP1) در سیستم پروکاریوتی و بررسی اثر ضد قارچی آن بر رشد برخی قارچ های بیماری زای گیاهی

نگارش:

نادیا شافعی

این پایان نامه توسط کمیته داوری مورد تأیید قرار گرفته

و با درجه ارزیابی گردید.

استاد راهنما: جناب آقای دکتر محمد رضا زمانی

استاد راهنما: جناب آقای دکتر مصطفی مطلبی

داور: جناب آقای دکتر سید امیر موسوی

داور: سرکار خانم دکتر لیلا فرآورده

سرپرست آموزش: جناب آقای دکتر شهبانی

تقدیم به آنان که وجودم جز هدیه وجودشان نیست

پدر و مادر عزیزم

آنان که با محبت بی دریغشان در تمامی لحظات رفیق راه و

پشتیبانم بودند و

تقدیم به همسر عزیز و مهربانم که حضور پر مهرش گرمابخش

زندگی ام و پشتوانه ی راهم است.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق »

بسی شایسته است از اساتید فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر

زمانی و آقای دکتر مطلبی که با کرامتی چون خورشید ، سرزمین

دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با

راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند ؛ تقدیر و تشکر

نمایم

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

چکیده فارسی:

در این تحقیق ژن دفنسین (RS-AFP1) گیاه تربچه با استفاده از PCR از ناقل pUC19 جداسازی و سپس در ناقل بیانی pET26b(+) کلون گردید. صحت کلون شدن ژن در ناقل با استفاده از Colony PCR وهضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت و ناقل نوترکیب حاصله pET26RS1 نام گذاری گردید. ناقل pET26RS1 به باکتری *E. coli* BL21(DE3) pLyss منتقل گردید و با IPTG ۱میلی مولار و در دما های ۳۷ و ۲۸ درجه سانتیگراد القاء٦ گردید. نتایج به دست آمده هیچ گونه بیان قابل اندازه گیری را نشان نداد. پس از ناقل pET 24d(+)استفاده گردید. این ناقل نیز دارای خصوصیاتی مشابه ناقل pET26b(+) می باشد اما فاقد توالی *pel B* می باشد. ژن *RS-AFP1* در این ناقل کلون شده و به باکتری *E. coli* BL21(DE3)pLysS منتقل گردید. اثر فاکتورهای مختلف IPTG، دما و زمان نمونه گیری بعد از القاء بر روی بیان RS- AFP1 با استفاده از تست تاگوچی بهینه سازی گردید. بر اساس این تست ، از چهار سطح مختلف IPTG (۰/۲ mM، ۰/۵، ۰/۷ و ۱)، زمان های مختلف القاء (۲، ٤، ٦و ١٦ ساعت بعد از القاء) و درجه حرارت(۲۳، ۲۸، ۳۰و ۳۷ درجه سانتیگراد) در ١٦ حالت بررسی گردید. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز پروتئین های حالت های مختلف با ژل اسکنر کمی گردید. نتایج حاصله نشان داد که دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و غلظت ۱ میلی مولار IPTG و زمان ٦ ساعت بعد از القاء بهترین شرایط بیان RS-AFP1 در باکتری *E. coli* می باشد. اثر پروتئین های به دست آمده بر قارچ های *Alternaria brassicola*، *Botritis cinerea* و *Scholorotinia sclorotirium* با استفاده از دو روش Radial Diffusion و Spore Germination بررسی گردید. نتایج حاصله نشان داد که این پروتئین می تواند رشد قارچ های فوق را مهار کند وبیشترین اثر را بر *A. brassicola* دارد.از این رو می توان نتیجه گرفت که پروتئین مزبور در سیستم پروکاریوت به صورت فعال بیان می گردد و می تواند رشد قارچ را مهار کند.

کلمات کلیدی: دفنسین تربچه ، RS-AFP1 ، تست تاگوچی، بهینه سازی بیان، *بیان پروکاریوتی*

فهرست

مقدمه..... ۱

هدف از تحقیق..... ٤

فصل ۲..... ٥

۲-۱-مقاومت غیر فعال..... ٦

۲-۲- مقاومت القایی..... ۷

۲-۲-۱-پروتئین های **PR2**..... ۹

۲-۲-۲-پروتئین های **PR3, PR8, PR11**..... ۱۰

۲-۲-۳-پروتئینهای **PR4**..... ۱۰

۲-۲-٤-پروتئین های **PR5**..... ۱۰

۲-۲-٥-پروتئین های عبور کننده از چربی (**TLP**)..... ۱۰

۲-۲-٦-پروتئین متصل شونده به میروزین (**MBP**)..... ۱۱

۲-۲-۷-پروتئین های **PR12** و **PR13**..... ۱۱

۲-۳-چگونگی فعالیت دفنسین ها..... ۱۳

۲-۳-۱-چگونگی فعالیت های دفاعی دفنسین های گیاهی..... ۱٤

۲-۳-۱-۱-مهار سنتز پروتئین..... ۱٥

۲-۳-۱-۲-مسدود کننده کانال Na^+..... ۱٥

۲-۳-۱-۳-مهار آنزیم α-آمیلاز..... ۱٥

۲-۳-۱-٤-مهار آنزیم های پروتئاز (تریپسین، کیموتریپسین)..... ۱٥

۲-٤-دسته بندی دفنسین های گیاهی.....۱۹

۲-٤-۱-رسم درخت فیلوژنی مولکولی ۲۰

۲-۵-ساختار **RS-AFP**.....۲۱

۲-٦-چگونگی عملکرد **Rs-AFP**.....۲۳

۲-۷-سیستم های بیانی پروتئین های نوترکیب.....۲٤

۳-مواد و روش ها.....۲۳

۳-۱-**Microbial Strains** ۲٤

۳-۲- ناقل ها.....۲٤

۳-۲-۱- وکتور **pET-26b(+),pET-24d(+)** ۲۵

۳-۳- پرایمرها.....۲۹

۳-٤- محیطهای کشت ۳۰

۳-٤- ۱- محیط **LB** (**Luria-Bertani**) ۳۰

۳-٤- ۲- محیط **SOB**.....۳۰

۳-٤- ۳- محیط کشت **PDA**.....۳۱

۳-۵- محلولها و معرف ها.....۳۱

۳-۵-۱- **Ethidium Bromide solution (10 mg/ml)**.....۳۱

۳-۵-۲-(**Bromophenol blue solution (0.4% w/v**.....۳۱

۳-۵-۳- **X-gal solution (2% w/v)**.....۳۱

۳-۵-٤- (**IPTG solution (20% w/v**.....۳۱

۳-۵-۵- محلول های لازم برای استخراج پلاسمید در مقیاس کم به روش لیز قلیای..... ۳۱

۳-۵-۵-۱- **Alkaline lysis solution I** ۳۱

۳-۵-۵-۲- **Alkaline lysis solution II** ۳۱

۳-۵-۵-۳- **Potassium acetate solution (5M)** ۳۲

۳-۵-۵-٤- **Alkaline lysis solution III** ۳۳

۳-۵-۶- **DNA loading dye solution (6X)** ۳۳

۳-۵-۷- محلول های آنتی بیوتیک..... ۳۳

۳-۵-۷-۱- **Ampicillin stock solution (100 mg/ml)**..... ۳۳

۳-۵-۷-۲- **Kanamycine stock solution (50 mg/ml)** ۳٤

۳-۵-۸- **Acrylamide / bisacrylamide stock solutions** ۳٤

۳-۵-۹- **Acrylamide electrophoresis buffer(5X)** ۳٤

۳-۵-۱۰- **Destaining solution** ۳٤

۳-۵-۱۱- **Protein dye stainig (Coomassie staining) solution** ۳۵

۳-۵-۱۲- **Protein sample buffer** ۳۵

۳-۵-۱۳- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز الکتروفورز **DNA** در ژل آگارز **TBE (Tris-Borate-EDTA) buffer**

..... ۳۵

۳-۵-۱٤- محلول‌های لازم برای **PCR**..... ۳٦

۳-۵-۱۵- محلول‌های مورد نیاز برای تهیه سلول‌های باکتریائی مستعد..... ۳٦

۳-۵-۱۶- PBS (Phosphate-buffered Saline) ۳۶

۳-۵-۱۷- Protein extraction buffer ۳۶

۳-۶- کیت های مورد استفاده ۳۷

۳-۷- مارکرهای استفاده شده در بخش مولکولی و پروتئینی ۳۷

۳-۸- کشت باکتری ۳۸

۳-۸-۱- کشت باکتری در محیط مایع ۳۸

۳-۸-۲- کشت بر روی محیط جامد (پلیت) ۳۸

۳-۸-۳- روش‌های مربوط به کشت و نگهداری باکتری ها ۳۸

۳-۹- استخراج پلاسمید ۳۹

۳-۱۰- تهیه ژل آگارز ۳۹

۳-۱۱- رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید ۴۰

۳-۱۲- Agarose gel electrophoresis ۴۰

۳-۱۳- DNA gel purification ۴۰

۳-۱۴- هضم آنزیمی محصول PCR جهت کلونینگ ۴۱

۳-۱۵- تهیه Ligation Mix ۴۲

۳-۱۶- آماده سازی سلولهای مستعد ۴۳

۳-۱۷- ترانسفورمیشن سویه های *E. coli* ۴۳

۳-۱۸- روشهای انتخاب باکتری های ترانسفورم شده ۴۴

۳-۱۸-۱- Clone Analysis by PCR ۴۴

۳-۱۹- تعیین توالی ۴۵

۳-۲۰- استخراج پروتئین تام (**total protein**).....۴۵

۳-۲۱- تهیه **SDS-PAGE**.....۴۵

۳-۲۲- بیان پروتئین های نوترکیب سیستم **pET** در سویه ***E. coli* BL21(DE3)**.....۴۶

۳-۲۳- روش زیست سنجی.....۴۷

۳-۲۳-۱- **radial diffusion assay** ۴۷

۳-۲۳-۲.**Spore germination**.....۴۸

۳-۲۴- مطالعات بیوانفورماتیک ۴۸

۴-نتایج.....۴۹

۴-۱- بهینه سازی شرایط **PCR**.....۵۱

۴-۲- بیان ژن **RS-AFP1** در باکتری ***E. coli***.....۵۲

۴-۲-۱- کلون کردن **RS-AFP1** در وکتور بیانی **(+)pET26b** با سیگنال پپتید.....۵۲

۴-۲-۱-۱- تایید پلاسمید نوترکیب به روش هضم آنزیمی ۵۵

۴-۲-۲- ترانسفورم کردن باکتری ***E. coli* BL21 (DE3)Plyss** با پلاسمید نوترکیب

PET26RS1 و بیان پروتئین دفنسین ۵۵

۴-۳- کلون کردن **RS-AFP1** در وکتور **pET 24d(+)** ۵۸

۴-۳-۱- تایید پلاسمید نوترکیب به روش هضم آنزیمی.....۶۰

۴-۳-۲- تعیین توالی ژن **RS-AFP2** کلون شده در پلاسمید نوترکیب **pET 24 d(+)**..... ۶۲

٤-٣-٣- ترانسفورم کردن باکتری ***E. coli*** **BL21 (DE3)Plyss** با پلاسمید نوترکیب **PET24RS1** و بیان پروتئین دفنسین.....٦٢

٤-٣-٤- بهینه سازی شرایط بیان با استفاده از تست تاگوچی.....٦٤

٤-٤- بررسی فعالیت ضد قارچی **RS-AFP1**.....٦٩

٤-٤-١- **Radial diffusion assay**.....٦٩

٤-٤-٢- **Spore germination**.....٧٢

٥-بحث و نتیجه گیری.....٧٦

٦-پیشنهادات.....٨١

٧- منابع.....٨٢

٨- **Abstract**.....٩٠

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

فهرست شکل‌ها

شکل۱):درخت فیلوژنی مولکولی مربوط به دفنسین گیاهان..... ۲۰

شکل۲):توالی دفنسین های تربچه..... ۲۲

شکل۳):ساختار سه بعدی RS-AFP1..... ۲۲

شکل۳-۱): نقشه پلاسمیدpET26b(+)..... ۳۱

شکل۳-۲): نقشه پلاسمید pET-24d(+)..... ۳۲

شکل۳-۳): الگوی الکتروفورزی مارکرهای استفاده شده در این تحقیق..... ۴۳

شکل٤-۱): PCR وکتور pUC19 با استفاده از آنزیم pfuپلی مراز ۵۲

شکل٤-۲):الگوی الکتروفورزی DNA تکثیر شده حاصل از کلونی های ایجاد شده در پلیت کانامایسیین

..... ۵۳

شکل٤-۳): محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب..... ۵٤

شکل٤-٤): مقایسه الگوی الکتروفورزی کلنی‌های نوترکیب با استفاده از colony PCR با پرایمر های

یونیورسال..... ۵٤

شکل ٤-۵): تأیید پلاسمید نوترکیب حاوی ژن RS-AFP1 با استفاده از الگوی هضم

آنزیمی..... ۵۵

شکل ٤-٦):نتایج SDS-PAGE پروتئین total حاصل از بیانpET26RS1

..... ۵٦

شکل٤-۷): نتایج SDS-PAGE پروتئین پری پلاسمی حاصل از بیانpET26RS1..... ۵۷

شکل ٤-۸):نتیجه وسترن بلات پروتئین بیان شده حاصل از بیانpET26RS1 ..... ۵۷

شکل٤-٩): الگوی الکتروفورزی DNA تکثیر شده حاصل از کلونی های ایجاد شده در پلیت کانامایسیین ٥٩

شکل٤-١٠): محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب pET24RS1..... ٥٩.

شکل ٤-١١): مقایسه الگوی الکتروفورزی کلنی‌های نوترکیبpET24RS1 با استفاده از colony PCR با پرایمر های یونیورسال..... ٦٠

شکل ٤-١٢):تصویر شماتیک هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET24RS1 ..... ٦١

شکل ٤-١٣): تأیید پلاسمید نوترکیب **pET24RS1** با استفاده از الگوی هضم‌آنزیمی..... ٦١

شکل ٣-١٤): نتایج SDS-PAGE پروتئین total حاصل از بیان pET26RS1 ..... ٦٣

شکل٤-١٥): نتیجه وسترن بلات پروتئین بیان شده حاصل از بیانpET24RS1..... ٦٤

شکل٤-١٦):نتایج حاصل از بیان ژن RS-AFP1 با استفاده از تست تاگوچی ٦٧

شکل٤-١٧):نمودار حاصل از کمی کردن باند های بیانی ٦٨

شکل٤-١٨):تأثیر پروتئین بیان شده بر رشد قارچ ***Sclerotirium*** به روش Radial Diffiusion..... ٧٠

شکل٤-١٩): تأثیر پروتئین بیان شده بر رشد قارچ ***Alternaria brassicola*** به روش Radial Diffiusion..... ٧١

شکل٤-٢٠): تأثیر پروتئین بیان شده بر رشد قارچ Botritis Cinerea به روش Radial Diffiusion..... ٧٢

شکل٤-٢١): تأثیر پروتئین بیان شده بر اسپور قارچ ***Alternaria brassicola***..... ٧٤