بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه زنجان

پایان نامه تحصیلی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.)
در رشته بیوتکنولوژی

عنوان:

ارزیابی روش LAMP در تشخیص پنبه تراریخته

نگارش:

نیلوفر رستمخانی

استاد راهنما:

زنده یاد دکتر علی حق‌نظری

اساتید مشاور:

دکتر مسعود توحیدفر و مهندس ابوبکر مرادی

تیر ماه ۹۰

تقدیم به

روان پاک استاد فرهیخته و مهربانم

دکتر علی حق‌نظری

تقدیم به

پدر بزرگوار و مادر مهربانم

و خواهران عزیزم

و همسر خواهرم

تقدیر و تشکر

سپاس خداوندی را که سخنوران از ستودن او عاجزند، و حسابگران از شمارش نعمت های او ناتوان، و تلاشگران از ادای حق او درمانده‌اند.

قدردانی می‌نمایم از پدر بزرگوار و مادر مهربانم به پاس زحمات فراوانی که برای من متحمل شده-اند و آسودن من به فرسودن آن‌ها تمام شد. از خواهران عزیزم و همچنین همسر خواهرم به پاس همراهی و حمایتشان صمیمانه سپاسگذارم.

تقدیر و تشکر خاضعانه خود را نثار روح پاک استاد فرهیخته و مهربانم دکتر علی حق‌نظری می-نمایم که با راهنمایی‌های دلسوزانه و رفتار مهربانشان همواره پشتوانه محکمی برای ادامه مسیر من بودند.

از اساتید مشاور گرامی‌ام جناب آقای دکتر مسعود توحیدفر و آقای مهندس ابوبکر مرادی که کوشش‌های بسیاری را برای انجام این تحقیق نموده‌اند و بدون همکاری صمیمانه آن‌ها انجام آن مقدور نبود قدردانی می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر ملکی و سرکار خانم دکتر باقری که زحمت داوری پایان‌نامه را تقبل فرمودند سپاسگذارم. از جناب آقای دکتر عظیمی که علاوه بر قبول داوری پایان‌نامه در این مدت مرا یاری دادند و جناب آقای دکتر توکلی به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی کمال تشکر و قدردانی را دارم. از مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی سرکار خانم مهندس عظیمخانی سپاسگذارم.

و در پایان از تمامی همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم خانم ها سیده مریم یوسف موسوی، ستاره دارایی، مهسا مکانیک، مریم عرفان‌منش و آقایان محمد امین الماسی، محمد جواد رشیدابادی، سید محمد حسینی و علیرضا بابازاده نیز سپاسگذاری می‌کنم.

چکیده:

پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی می‌باشد. امروزه مهندسی ژنتیک موجب به وجود آمدن گیاهانی شده است که نسبت به آفات و پاتوژن‌ها از مقاومت بالایی برخوردارند. با افزایش توسعه و کاربرد گیاهان تراریخته روش‌های تشخیص و شناسایی آن‌ها بسیار مهم می‌باشد. روش های مولکولی مختلفی از جمله PCR و Real time PCR برای تشخیص و شناسایی به کار می‌روند. اما این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند نیاز به تجهیزات گران آزمایشگاهی می‌باشند. اخیرا روشی سریع و حساس به نام تکثیر هم دمای وابسته به حلقه LAMP توسعه یافته است. در روش LAMP نیازی به واسرشته سازی الگو وجود ندارد و تکثیر تحت یک دما انجام می‌گیرد. به این دلیل به دستگاه‌های گران قیمت مانند ترموسایکلر نیازی ندارد. در تحقیق حاضر جهت مقایسه دو روش LAMP و PCR از پنبه تراریخته حاوی ژن *CryIA(b)* و پنبه حاوی ژن *chi* استفاده شد. با استفاده از آغازگرهای حلقوی تکثیر در مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. همچنین نتیجه شد که این روش صد برابر از روش PCR حساس‌تر می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده روش LAMP در مقایسه با PCR معمولی برای تشخیص تراریخته‌ها سریع‌تر و ارزان‌تر و اختصاصی‌تر و حساس‌تر است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- کشت جهانی گیاهان تراریخته ۲

۱-۳- چشم انداز آینده کشت گیاهان تراریخته ۳

۱-۴- اهمیت شناسایی گیاهان تراریخته ۴

۱-۵- روش تشخیصی PCR ۵

۱-۶- روش تشخیصی Real-time PCR ۶

۱-۷- روش تشخیصی LAMP ۶

۱-۸- اهداف تحقیق حاضر ۷

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- مهندسی ژنتیک پنبه ۹

۲-۲- سطح زیر کشت گیاهان تراریخته ۱۰

۲-۳- اهمیت شناسایی گیاهان تراریخته ۱۱

۲-۴- روش‌های ارزیابی و تشخیص گیاهان تراریخته ۱۲

۲-۵- روش‌های تشخیص تراریخته‌ها بر پایه DNA ۱۲

۲-۵-۱- بررسی روش PCR ۱۳

۲-۵-۲- بررسی روش Real-time PCR ۱۳

۲-۵-۳- روش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه LAMP ۱۴

۲-۵-۳-۱- مزایای LAMP ۱۷

عنوان **صفحه**

۲-۳-۵-۲- میزان حساسیت روش LAMP ۱۷

۲-۶- مواد لازم برای انجام روش LAMP..... ۱۸

۲-۶-۱- آنزیم *Bst* پلی‌مراز ۱۸

۲-۶-۱-۱- ویژگی‌های آنزیم *Bst* پلی‌مراز..... ۱۸

۲-۶-۲- بافر و $MgSo_4$ ۲۰

۲-۶-۳- دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)..... ۲۰

۲-۶-۴- بتائین ۲۱

۲-۶-۵- آغازگرها..... ۲۲

۲-۶-۶- آغازگرهای حلقوی..... ۲۲

۲-۶-۷- طراحی آغازگر..... ۲۳

۲-۷- محدودیت روش LAMP ۲۴

۲-۸- مبانی علمی نحوه انجام واکنش LAMP..... ۲۵

۲-۸-۱- فاز مقدماتی واکنش LAMP..... ۲۵

۲-۸-۲- فاز اصلی واکنش LAMP..... ۲۹

۲-۹- روش‌های آشکارسازی در LAMP ۳۲

۲-۹-۱- روش‌های مشاهده‌ای ۳۲

۲-۹-۱-۱- تشخیص به وسیله کدورت سنجی ۳۲

۲-۹-۱-۲- تشخیص به وسیله رنگ‌های فلورسانسی..... ۳۴

۲-۹-۱-۳- تشخیص به وسیله مواد فلورسانس..... ۳۴

۲-۹-۱-۴- تشخیص به وسیله پلی اتیلن ایمین..... ۳۵

۲-۹-۲- روش الکتروفورز..... ۳۵

۲-۱۰- روش Real-time LAMP..... ۳۶

عنوان **صفحه**

۱۱-۲- روش RT-LAMP ۳۶

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- بذور گیاهان ۳۹

۳-۲- استخراج DNA ۴۰

۳-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۴۱

۳-۴- آغازگرها ۴۲

۳-۴-۱- آغازگرهای استفاده شده در PCR ۴۲

۳-۴-۲- آغازگرهای استفاده شده در Real-time PCR ۴۲

۳-۴-۳- آغازگرهای استفاده شده در LAMP ۴۳

۳-۵- انجام واکنش ۴۴

۳-۵-۱- انجام PCR ۴۴

۳-۵-۲- انجام Real-time PCR ۴۶

۳-۵-۳- انجام LAMP ۴۸

۳-۶- انجام الکتروفورز بر روی محصولات تولید شده ۵۱

۳-۶-۱- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۵۱

۳-۶-۲- الکتروفورز محصول LAMP روی ژل آگارز ۵۱

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۵۳

۴-۲- انجام PCR ژن‌های *cryIAb* و *chi* ۵۴

۴-۳- انجام Real-time PCR ژن‌های *cryIAb* و *chi* ۵۵

۴-۴- بهینه سازی فاکتورهای موثر در تست LAMP ۵۶

عنوان **صفحه**

۴-۴-۱- بهینه سازی دمای مطلوب جهت انجام واکنش ۵۶

۴-۴-۲- بهینه سازی Betaine جهت انجام واکنش ۵۷

۴-۴-۳- بهینه سازی آنزیم *Bst* DNA پلی‌مراز ۵۸

۴-۴-۴- بهینه سازی رقت dNTPs ۵۹

۴-۴-۵- زمان انجام واکنش LAMP ۶۰

۴-۵- انجام واکنش LAMP ۶۱

۴-۶- تشخیص مشاهده‌ای از طریق کدورت سنجی ۶۲

۴-۷- مقایسه اختصاصیت PCR(specificity) با LAMP ۶۳

۴-۸- مقایسه حساسیت PCR(sensitiviy) با LAMP ۶۵

۴-۹- نتیجه گیری ۶۶

۴-۱۰- پیشنهادات ۶۹

فهرست منابع ۷۱

فهرست جداول

جدول۳-۱ معرفی نمونه‌های گیاهی مورد بررسی به تفکیک لاین، نسل،نوع ژن و عمل مورد نظر ۳۹

جدول۳-۲ لیست توالی آغازگرهای استفاده شده در PCR برای ژن‌های *cryIAb* و *chi* ۴۲

جدول۳-۳ لیست توالی آغازگرهای استفاده شده در Real-time PCR برای *cryIAb* و *chi* ۴۳

جدول۳-۴ لیست توالی آغازگرهای استفاده شده در LAMP برای ژن‌های *cryIAb* و *chi* ۴۳

جدول۳-۵ زمان و دمای لازم جهت انجام چرخه‌های دمایی در PCR برای ژن *cryIAb* ۴۵

جدول۳-۶ زمان و دمای لازم جهت انجام چرخه های دمایی در PCR برای ژن *chi* ۴۵

جدول۳-۷ مواد مورد استفاده جهت انجام PCR برای ژن‌های *cryIAb* و *chi* ۴۶

عنوان **صفحه**

جدول۸-۳ مواد مورد استفاده در واکنش Real-timr PCR برای ژن‌های *cryIAb* و *chi*..... ۴۷
جدول۹-۳ زمان و دمای لازم جهت انجام Real-timr PCR برای ژن *cryIAb* ۴۷
جدول۱۰-۳ زمان و دمای لازم جهت انجام Real-timr PCR برای ژن *chi*..... ۴۸
جدول۱۱-۳ مواد مورد استفاده در واکنش LAMP برای ژن *cryIAb*..... ۴۹
جدول۱۲-۳ مواد مورد استفاده در واکنش LAMP برای ژن *chi*..... ۵۰

فهرست اشکال

شکل ۱-۲ نمایش آغازگرها و ژن هدف در واکنش LAMP..... ۲۲
شکل۲-۲ نمایش شماتیک مکانیسم عمل آغازگرهای حلقوی در واکنش LAMP ۲۳
شکل ۳-۲ مرحله اول..... ۲۶
شکل ۴-۲ مرحله دوم..... ۲۶
شکل ۵-۲ مرحله سوم..... ۲۷
شکل ۶-۲ مرحله چهارم..... ۲۷
شکل ۷-۲ مرحله پنجم..... ۲۸
شکل۸-۲ مرحله ششم..... ۲۹
شکل۹-۲ مرحله هفتم..... ۲۹
شکل۱۰-۲ مرحله هشتم..... ۳۰
شکل۱۱-۲ مرحله هشتم تا یازدهم..... ۳۹
شکل۱-۳ توالی اسید نوکلوئیک ژن‌های *cryIAb* و *chi* مورد استفاده در طراحی آغازگرهای LAMP ۴۴
شکل۱-۴ تعیین کیفیت و کمیت DNA ژنومی پنبه حاوی ژن *cryIAb* با ژل آگارز یک درصد ۵۳
شکل۲-۴ تعیین کیفیت و کمیت DNA ژنومی پنبه حاوی ژن *chi* با ژل آگارز یک درصد..... ۵۳

عنوان **صفحه**

شکل۳-۴ انجام واکنش PCR با ژن *cryIAb* ۵۴
شکل۴-۴ انجام واکنش PCR با ژن *chi* ۵۴
شکل۵-۴ انجام واکنش Real-time PCR با ژن *cryIAb* ۵۵
شکل۶-۴ انجام واکنش Real-time PCR با ژن *chi* ۵۵
شکل۷-۴ الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب دمای موثر برای انجام واکنش..... ۵۶
شکل۸-۴ الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب رقت مناسب Betaine ۵۷
شکل۹-۴ الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب رقت مناسب آنزیم *Bst* DNA پلی‌مراز..... ۵۸
شکل۱۰-۴ الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب رقت مناسب dNTPs..... ۵۹
شکل۱۱-۴ تعیین زمان تکثیر در واکنش LAMP با استفاده از ژن *cryIAb* ۶۰
شکل۱۲-۴ انجام واکنش LAMP با ژن *cryIAb* ۶۱
شکل۱۳-۴ انجام واکنش LAMP با ژن *chi* ۶۲
شکل۱۴-۴ نمایش کدورت سنجی بعد از انجام واکنش LAMP ۶۳
شکل۱۵-۴ مقایسه اختصاصیت (Specificity)LAMP و PCR برای ژن *cryIAb*..... ۶۴
شکل۱۶-۴ مقابسه اختصاصیت (Specificity)LAMP و PCR برای ژن *chi* ۶۴
شکل۱۷-۴ مقایسه حساسیت (Sensitivity) LAMP با PCR برای ژن *chi*..... ۶۵

فصل اول:

مقدمه

۱-۱. مقدمه

امروزه علم مهندسی ژنتیک در پزشکی، تولید سوخت، کشاورزی و تولید غذا کاربرد دارد. در زمینه بیوتکنولوژی کشاورزی، مهندسی ژنتیک راه‌های جدیدی را پیش روی بشر گشوده است که او را قادر می‌سازد گیاهانی با خصوصیات جدید تولید نماید. موجود تغییر یافته ژنتیکی[1] معمولا به صورت ارگانیسم زنده‌ای که ریخته ژنتیکی آن با مهندسی ژنتیک تغییر یافته است، تعریف می‌شود. در عرصه کشاورزی و محیط زیست به منظور تولید گیاهان مقاوم به آفات و بیماری‌ها و تولید محصول به روش مهندسی ژنتیک قدم‌های بسیار مهمی بر داشته شده است، به طوری که کشورهای آمریکا، کانادا، آرژانتین و چین ذرت، گندم، برنج، پنبه، سویا و کدوی مقاوم به علف کش‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها و هم چنین محصولات با بازدهی غذایی بالاتر تولید کرده‌اند (یانگ[2]، ۲۰۰۲).

۱-۲. کشت جهانی گیاهان تراریخته

در نتیجه بهره‌وری بیشتر، منافع اقتصادی، رفاهی و زیست محیطی مستمر و پایدار ناشی از کشت محصولات تراریخته، در سال ۲۰۰۹ رکورد ۱۴ میلیون کشاورز بزرگ و خرده پا در ۲۵ کشور جهان که ۱۳۴ میلیون هکتار را به زیرکشت محصولات تراریخته برده‌اند، بر جای گذاشته شد که رشدی معادل هفت درصد را نسبت به سال ۲۰۰۸ نشان می‌دهد. رشد ۸۰ برابری مساحت زیر کشت محصولات تراریخته نسبت به سال ۱۹۹۶ بی‌سابقه بوده و موجب می‌شود تا کشت محصولات تراریخته به عنوان سریع‌ترین فناوری مورد پذیرش در تاریخ اخیر کشاورزی باشد . در سال ۲۰۰۹ در مورد چهار محصول تراریخته اصلی تجاری سازی شده یعنی ذرت،

[1] Genetically Modified Organism (GMO)
[2] Yang.

سویا، کلزا و پنبه رکورد جدیدی گزارش شد. برای اولین بار بیش از سه چهارم سویای تولید شده در جهان تراریخته است. کل مساحت زیر کشت سویا در دنیا ۹۰ میلیون هکتار است. سطح زیر کشت پنبه در دنیا ۳۳ میلیون هکتار است که نیمی از این میزان به تولید پنبه تراریخته اختصاص یافت. همچنین از کل ۱۵۸ میلیون هکتار سطح زیر کشت ذرت در دنیا یک چهارم به تولید محصول تراریخته اختصاص یافته است و کلزای تراریخته به بیش از یک پنجم سطح زیر کشت جهانی این محصول رسید(ISAAA[1]).

۳-۱. چشم انداز آینده کشت گیاهان تراریخته

موج جدیدی از محصولات تراریخته بین سالهای ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۵ در راه است. در این راستا لازم است تا اولویت اول بر کارآمد کردن سیستم‌های نظارتی مناسب مسئولانه، ارزان و به هنگام متمرکز شود. کشت محصولات تراریخته در دنیا در دومین دهه تجاری سازی این محصولات از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۵ از نظر سطح زیر کشت، تعداد کشورها و کشاورزانی که این محصولات را کشت خواهند کرد، دو برابر خواهد شد. ضمن آنکه محصولات تراریخته جدید و مناسبی برای تامین اولویتهای جامعه جهانی به ویژه در کشورهای در حال توسعه آسیا، آمریکای لاتین و آفریقا به طور مستمر و فزاینده تامین خواهد شد(ISAAA).

[1] Inrernational Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications

۴-۱. اهمیت شناسایی گیاهان تراریخته

در سال های اخیر پیشرفت‌های مهندسی ژنتیک در ایجاد موجودات تغییر یافته ژنتیکی باعث ورود گسترده محصولات این فناوری و به خصوص گیاهان تراریخته به بازار مصرف شده است. این موضوع احتمال دارد اثراتی در محیط، تنوع زیستی و سلامتی انسان داشته باشد. این امر نگرانی‌های سازمان‌های دولتی و عامه مردم را در نقاط مختلف جهان، درمورد استفاده از این محصولات در پی داشته است. اروپا، آمریکا، ژاپن، کانادا و کشورهای دیگر در سراسر دنیا کنترل‌های ایمنی مربوط به غذاهای تراریخته را که قصد ورود به بازار را دارند تدارک دیده‌اند. تا به حال در اتحادیه اروپا چهارچوب وسیعی از موارد امنیتی، جنبه‌های مختلف از رهاسازی گیاهان تراریخته گرفته تا محصولات نهایی حاصل از آن گیاهان را کنترل می‌کند. توانایی شناسایی تراریخته‌ها یک امر ضروری می‌باشد (لی و همکاران[1]، ۲۰۰۹).

در همین راستا روش‌های تشخیصی مختلفی مانند LAMP، PCR، Real-time PCR ابداع شده‌اند تا بتوانند محصولات تراریخته را ردیابی کنند.

[1] Lee *et al.*

۵-۱. روش تشخیصی PCR

روشی که اخیرا" برای آنالیز گیاهان تراریخته بسیار استفاده می شود، تکنیک PCR می باشد. گر چه این روش دارای مزایای بسیاری است اما دارای محدودیت‌هایی نیز می باشد که می‌توان به این موارد اشاره نمود:

۱- استفاده از چرخه‌های حرارتی جهت تکثیر (۳۰ تا ۴۰ چرخه) که زمان زیادی را می طلبد.

۲-استفاده از دستگاه ترموسایکلر که گران است.

۳- روش‌های آشکارسازی و تشخیص محصول PCR، که عمدتا" با مشکلاتی نظیر استفاده ازمواد سمی و خطرناک مثل اتیدیوم بروماید همراه است (الیور و همکاران[1]، ۲۰۰۲ و فیگارو – بوسی[2] و همکاران، ۱۹۹۹).

اگر چه روش‌های مبتنی بر PCR روش‌های حساس و سریعی هستند، اما محدودیت‌های ذکر شده موجب گردیده تا این روش‌ها تنها در آزمایشگاه‌های مجهز که دارای افراد متخصص در این زمینه‌اند به کار گرفته شوند.

[1] Oliveira *et al.*
[2] Figueroa-Bossi *et al.*

۶-۱. روش Real-time PCR

استفاده از دستگاه ترموسایکلر و ژل گذاری در PCR محدودیت‌هایی را جهت به کارگیری این روش در آزمایشات صحرایی و مزرعه‌ای ایجاد می‌کند. دانشمندان تلاش بسیاری را جهت حذف این محدودیت‌ها نموده‌اند که از جمله این تلاش‌ها ابداع روش Real-time PCR می‌باشد که سبب حذف مورد ژل گذاری گردیده و با استفاده از آغازگرهای نشاندار با مواد فلورسنت و بهره‌گیری از دستگاه فلوریمتر همزمان با انجام فرایند تکثیر ژن در دستگاه چرخه حرارتی، تشخیص حضور محصول به طور هم زمان صورت می‌گیرد.

۷-۱. روش تشخیصی LAMP[1]

با توجه به موارد ذکر شده نیاز به روشی ساده با کارایی بالاتر است تا بتواند محدودیت‌های روش‌های پیشین را مرتفع نماید و در آزمایشگاه‌های عادی و کوچک حتی توسط افراد غیر متخصص نیز قابل انجام باشد. روش جدیدی جهت تکثیر اسیدهای نوکلئیک به نام تکثیر هم دمای وابسته به حلقه (LAMP)، توسط نوتومی و همکاران[2] (۲۰۰۰) معرفی گردید که واجد این مشخصات است.

۱- DNA با کارایی و سرعت بالا به صورت اختصاصی در یک دما تکثیر می‌شود.

۲- از ۴ یا ۶ آغازگر استفاده می‌شود که در مجموع شش یا هشت ناحیه ژنی از DNA هدف را مورد شناسایی قرار می‌دهند، که همین امر باعث اختصاصیت بسیار بالای این روش می‌گردد و طی فرایند پیوسته و دنباله‌داری با تشکیل نواحی سنجاق سری در دمای ۶۰-۶۵ درجه

[1] Loop Mediated Isothermal Amplification
[2] Notomi *et al.*

سانتی‌گراد و استفاده از یک آنزیم DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت با خاصیت جایگزینی رشته تکثیر می‌یابد (نوتومی و همکاران، ۲۰۰۰).

۳-کارایی تکثیر در روش LAMP بسیار بالاست و قادر است مقدار اندکی از DNA (حتی کمتر از شش کپی) را تا $۱۰^{۱۰}$ کپی تکثیر نماید.

۴- امکان آشکارسازی نتیجه نهایی واکنش بر اساس کدر شدن محیط عمل واکنش که به واسطه آزاد شدن پیروفسفات از dNTPها و ترکیب آن‌ها با یون‌های منیزیم در حین واکنش ایجاد می‌گردد، امکان آنالیز نتایج را آسان می‌نماید که این مورد در بین تمام روش‌های مولکولی تکثیر DNA بی‌نظیر است (موری و همکاران[1]، ۲۰۰۱).

۸-۱. اهداف تحقیق حاضر

با توجه به اهمیتی که شناسایی گیاهان تراریخته دارند، بر آن شدیم تا روشی را ارائه دهیم که در آزمایشگاه‌های نه چندان پیشرفته هم قابل انجام باشد. در مواردی مانند گمرک که امکان به کارگیری وسایل مجهز نیست، روش LAMP می‌تواند روش کارایی در ارزیابی محصولات وارداتی باشد.

[1] Mori *et al.*

فصل دوم:

بررسی منابع