دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

شناسایی و جداسازی راه‌انداز القائی rd29A از گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و ارزیابی عملکرد آن در گیاه تراریخت اطلسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

مهرنوش شکوهی

اساتید راهنما

دکتر سیروس قبادی

دکتر بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی

۱۳۹۳

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی خانم مهرنوش شکوهی

تحت عنوان

شناسایی و جداسازی راه‌انداز القائی rd29A از گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و ارزیابی عملکرد آن در گیاه تراریخت اطلسی

در تاریخ ۹۳/۱۰/۱۳ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر سیروس قبادی
۲- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی
۳- استاد داور	دکتر بهرام شریف‌نبی
۴- استاد داور	دکتر امیر مساح
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر محمد مهدی مجیدی

به نام خداوندی که داشتن او جبران همه نداشته‌های من است

سپاس و ستایش اهورا را سزد، خداوند و مهتر و آفریدگار جهان و جهانیان.

او را بینهایت شاکرم که به من توفیق عنایت فرمود تا به انجام رسانم هر آنچه را که با یادش آغاز کردم.

سپاس بیکران از پدر و مادر عزیزتر از جانم که به من چگونه زیستن را آموختند، مشوق راه دانشم بودند و اکنون نیز وجودشان استوار کننده قدم هایم است و همچنین از برادر و خواهران دلسوزم که همواره تکیه گاه عاطفیم بودند، نهایت تشکر را دارم.

در طی انجام این پایان نامه همواره رهین منت انسان هایی شریف هستم، زحمات اساتید راهنمای عزیز و بزرگوارم جناب آقای دکتر سیروس قبادی و جناب آقای دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی، که با صبر و حوصله بسیار مرا در مسیر این پایان نامه هدایت فرمودند و روح فعالیت را در من برانگیختند. از اساتید ارجمند، آقایان دکتر بهرام شریف نبی و دکتر امیر مساح که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را تقبل نمودند صمیمانه قدردانی می نمایم.

بر خود لازم می دانم از دوست و معلم عزیزم سرکار خانم دکتر غزاله خاکسار قدردانی نمایم که خط به خط این نوشته را با من آمدند و آمدنشان منتهای دوستی و مهرشان بود. از زحمات کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی جناب آقای مهندس محمدی، سرکار خانم مهندس افاضل و تکنسین آزمایشگاه جناب آقای عزیزی، سپاسگزارم.

از دوست‌های مهربانم خانم ها نیلوفر چانی، سمانه سیاپوش و آقایان رضا دبونیا، مرتضی قربانی و رحیم ملک زاده که در مسیر این کار صمیمانه مرا همراهی کردند نیز سپاسگذارم. نام های ذکر شده مجموعه ای قلم نوشته اند که هیچ ترتیبی بر آن نمی توان نهاد، اگر نامی در آن نیست حکایت از نبودن یاد نیست و خورده بر قلم می رود نه بر من.

مهرنوش شکوهی

زمستان ۹۳

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و

نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق

به دانشگاه صنعتی اصفهان است

اگر شایسته باشد

تقدیم به

همراهان همیشگی ام

به آنان که چراغ راهم هستند

به

پدر و مادرم

و نیز

برادر و خواهرانم

عزیزانی که هیچ گاه پاسخگوی زحمات بی دریغشان نخواهم بود

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشتم
فهرست اشکال ..... دوازدهم
فهرست جداول ..... پانزدهم

چکیده ۱

فصل اول: مقدمه

۱-۱- پیشگفتار ۲
۱-۲- راه‌انداز و تنظیم بیان ژن ۲
۱-۲-۱- هسته راه انداز ۳
۱-۳- عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به محرک‌های محیطی ۵
۱-۴- سایر عناصر تنظیمی موثر در بیان ژن‌ها ۹
۱-۵- انواع راه‌اندازها ۱۱
۱-۶- تنش و تنظیم بیان ژن ۱۲
۱-۷- بررسی و مطالعه عوامل رونویسیDREB ۱۳
۱-۷-۱- پروتئین‌هایDREB1/CBFs و مقاومت به تنش سرما ۱٤
۱-۷-۲- پروتئین‌های DREB2 در تنش‌های شوری، خشکی و گرما ۱۵
۱-۸- تشدید بیان ژن به کمک راه‌اندازهای القائی ۱۵
۱-۹- راه‌انداز القائیrd29A ۱٦
۱-۱۰- پیشینه تحقیق ۱۷
۱-۱۱- اطلسی و اهمیت آن ۱۸
۱-۱۲- بیان مسئله و هدف تحقیق ۱۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- بررسی توالی به روش زیست‌رایانه‌ای و طراحی آغازگرها ۲۰
۲-۲- کشت درون شیشه ای آرابیدوپسیس ۲۱
۲-۳- استخراج DNA ژنومی از گیاه آرابیدوپسیس ۲۳
۲-۴- بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده ۲٤
۲-۴-۱- روش بیوفتومتری ۲٤

۲-۴-۲- روش ژل الکتروفورز ۲۴
۲-۵- واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ۲۵
۲-۶- انتقال قطعات تکثیر شده به پلاسمید ۲۶
۲-۷- تهیه سلول‌های مستعد باکتری *Escherichia coli* ۲۷
۲-۸- انتقال پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر به باکتری‌های مستعد شده *E.coli* ۲۷
۲-۹- کلونی PCR ۲۸
۲-۱۰- استخراج پلاسمید از باکتری E. coli (استخراج پلاسمید در حجم کوچک) ۲۹
۲-۱۱- تایید وجود راه‌انداز rd29A در پلاسمید با برش آنزیمی ۳۰
۲-۱۲- توالی‌یابی پلاسمید حاوی راه‌انداز rd29A ۳۱
۲-۱۳- ساخت دستواره pBI121:rd29A:*gus* (همسانه‌سازی راهانداز rd29A در پلاسمید pBI121) ۳۲
۲-۱۳-۱- جداسازی راه‌انداز CaMV35S از پلاسمید pBI121 ..... ۳۲
۲-۱۳-۲- تکثیر راه‌انداز rd29A از پلاسمید pTZ57R/T ۳۲
۲-۱۳-۳- خالص کردن راه‌انداز rd29A و پلاسمید pBI121 به طور جداگانه از ژل ۳۲
۲-۱۳-۴- اتصال راه‌انداز rd29A به پلاسمید pBI121 ..... ۳۳
۲-۱۳-۵- استخراج پلاسمید pBI121 از باکتری *E. coli* XL1 blue و انجام مراحل تایید مولکولی ۳۴
۲-۱۴- ساخت دستواره pBI121:rd29A:*DREB1B* ۳۵
۲-۱۴-۱- خارج کردن راه‌انداز rd29A از پلاسمید pBI121 حاوی دستواره pBI121:rd29A:*gus* ۳۵
۲-۱۴-۲- جداسازی راه‌انداز 35S از پلاسمید pBI121 حاوی دستواره pBI121:35S:*DREB1B* ۳۶
۲-۱۴-۳- خارج کردن ژن *DREB1B* از پلاسمید pBI121 حاوی دستواره pBI121:35S:*DREB1B* ۳۶
۲-۱۴-۴- جداسازی ژن *gus* از پلاسمید pBI121 حاوی دستواره pBI121:rd29A-899bp:*gus* ۳۷
۲-۱۴-۵- خالص کردن راه‌انداز rd29A و ژن *DREB1B* و پلاسمید pBI121 به طور جداگانه از ژل ۳۸
۲-۱۴-۶- اتصال راه‌انداز rd29A و ژن *DREB1B* به پلاسمید pBI121 ..... ۳۸
۲-۱۴-۷- استخراج پلاسمید pBI121 حاوی راه‌انداز از باکتری E. coli XL1 blue و انجام مراحل تایید مولکولی ۳۸
۲-۱۴-۸- بررسی برهمکنش فاکتور رونویسی DREB1B به صورت زیست‌رایانه‌ای ۴۱
۲-۱۵- ساخت دستواره pBI121:rd29A:*nptII* (همسانه‌سازی راه‌انداز rd29A در پلاسمید pBI121 حاوی ژن *nptII*) ۴۱
۲-۱۵-۱- جداسازی راه‌انداز nos از پلاسمید pBI121 ..... ۴۱
۲-۱۵-۲- جدا کردن راه‌انداز rd29A از پلاسمید pTZ57R/T ۴۱
۲-۱۵-۳- خالص کردن راه‌انداز rd29A و پلاسمید pBI121 حاوی ژن *nptII* به طور جداگانه از ژل ۴۲

۱-۱۵-۴- اتصال راه‌انداز rd29A به پلاسمید pBI121 ..... ۴۲

۲-۱۵-۵- استخراج پلاسمید pBI121 از باکتری *E. coli* XL1 blue و انجام مراحل تایید مولکولی ۴۲
۲-۱۶- انتقال دستواره‌ها به باکتری اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101) ۴۴
۲-۱۷- انتقال دستواره pBI121:rd29A:*nptII* (با دو توالی ۸۹۹ و ۱۲۶۰ جفت‌باز برای rd29A) به گیاه اطلسی ۴۵
۲-۱۸- تایید فیزیولوژیکی گیاهان تراریخت در شرایط تنش ۴۵
۲-۱۹- استخراج DNA ژنومی از گیاه اطلسی تراریخت ۴۶
۲-۲۰- تایید مولکولی گیاهان تراریخت ۴۶
۲-۲۰-۱- تایید از طریق PCR با آغازگر های اختصاصی ۴۶
۲-۲۰-۲- تایید بیان ژن *nptII* در گیاهان تراریخت از طریق RT-PCR ۴۶
۲-۲۱- استخراج RNA کل از گیاه تراریخت اطلسی ۴۶
۲-۲۱-۱- آماده سازی وسایل جهت استخراج RNA ۴۷
۲-۲۱-۲- استخراج RNA ۴۷
۲-۲۲- بررسی کیفی و کمی RNA استخراج شده ۴۸
۲-۲۲-۱- روش اسپکتروفتومتری ۴۸
۲-۲۲-۲- روش الکتروفورز ژل آگارز ۴۸
۲-۲۳- تهیه cDNA ۴۹
۲-۲۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس(RT-PCR) ۵۰

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- استخراج DNA آرابیدوپسیس ۵۲
۳-۲- جداسازی راه‌انداز rd29A از نمونه‌های آرابیدوپسیس به روش PCR ۵۲
۳-۳- همسانه‌سازی و توالی‌یابی راه‌انداز rd29A ۵۳
۳-۴- تایید وجود راه-انداز rd29A در پلاسمید pTZ57R/T ۵۳
۳-۵- تایید همسانه‌سازی و انتقال راه‌انداز rd29A به باکتری *E. coli* ۵۴
۳-۶- توالی‌یابی راه‌انداز rd29A و مطالعه زیست‌رایانه‌ای آنها ۵۵
۳-۷- ساخت دستواره pBI121-rd29A-*gus* ۵۶
۳-۸- تایید پلاسمید همسانه‌سازی شده (دستواره pBI121:rd29A:*gus*) ۵۸
۳-۹- ساخت دستواره pBI121:rd29A:*DREB1B* ۵۹
۳-۱۰- تایید پلاسمید همسانه‌سازی شده (دستواره pBI121:rd29A:*DREB1B*) ۶۳

۳-۱۱- مطالعه‌ی زیست‌رایانه‌ای برهمکنش فاکتور رونویسی *DREB1B* با پروتئین‌های دیگر ٦٤
۳-۱۲- ساخت دستواره pBI121:rd29A:*nptII* ۷۲

ده

۳-۱۳- تایید پلاسمید همسانه‌سازی شده (دستواره pBI121:rd29A:*nptII*) ۷۵
۳-۱۴- انتقال دستواره‌ها به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* ۷٦
۳-۱۵- انتقال دستواره pBI121:rd29A:*nptII* به گیاه اطلسی با استفاده از برگ ۷۸
۳-۱۶- تایید فیزیولوژیک گیاهان تراریخت ۸۰
۳-۱۷- آنالیز زیست‌رایانه‌ای عناصر تنظیمی راه‌انداز rd29A ۸۲
۳-۱۸- تایید مولکولی گیاهان تراریخت شده با دستواره pBI121:rd29A:*nptII* ۸۷
۳-۱۸-۱- تایید توسط PCR با آغازگرهای راه‌انداز rd29A ۸۷
۳-۱۸-۲- تایید فعالیت راه‌انداز و بیان ژن در گیاه تراریخت با RT-PCR ۸۸
فصل چهارم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها
۴-۱- نتیجه‌گیری کلی ۹۰
۴-۲- پیشنهادها ۹۱
منابع ۹٤

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- عناصر هسته راه‌انداز ۳
شکل ۱-۲- نواحی مختلف تنظیمی ژن‌های یوکاریوتی ۹
شکل ۱-۳- مدلی برای اختصاصی بودن تقویت‌کننده هسته راه‌انداز ۱۰
شکل ۱-٤- تصویر شماتیک از دو نوع مجزا از جداکننده‌ها ۱۱
شکل ۱-۵- فاکتورهای نسخه‌برداری و عناصر فعال سیس موجود در شبکه‌ی تنظیمی نسخه‌برداری ژن‌های القا شونده با تنش‌های محیطی. ۱۳
شکل ۱-٦- مسیر انتقال سیگنال سرما به DREB1A، و خشکی و شوری به DREB2A، و در انتها، القای ژن‌های پاسخ دهنده به تنش. ۱٤
شکل ۱-۷- تصویر شماتیک از عناصر فعال سیس موجود بر روی راه‌اندازهای القائیrd29A و rd29B ۱٦
شکل ۲-۱- موقعیت آغازگرها روی راه‌انداز rd29A ۲۱
شکل ۲-۲- محل قرارگیری راه‌انداز rd29A به طول ۸۹۹ جفت باز در پلاسمید pTZ57R/T ۳۱
شکل ۲-۳- محل قرارگیری راه‌انداز rd29A به طول ۱۲۶۰ جفت باز در پلاسمید pTZ57R/T ۳۱
شکل ۲-٤- محل راه‌انداز CaMV 35S در پلاسمید pBI121 ..... ۳۲
شکل ۲-۵- اتصال راه‌انداز rd29A به پلاسمید pBI121 حاوی ژن gus ۳۳
شکل ۲-٦- پلاسمید pBI121 حاوی راه‌انداز rd29A ۳٦
شکل ۲-۷- محل قرار گرفتن راه‌انداز 35S پلاسمید pBI121 ..... ۳٦
شکل ۲-۸- محل قرار گرفتن ژن *DREB1B* در پلاسمید pBI121 ..... ۳۷
شکل ۲-۹- محل قرارگیری ژن *gus* در پلاسمید pBI121 ..... ۳۷
شکل ۲-۱۰- اتصال راه‌انداز rd29A و ژن *DREB1B* به پلاسمید pBI121 ..... ۳۸
شکل ۲-۱۱- محل قرارگیری راه‌انداز nos در پلاسمید pBI121 ..... ٤۱
شکل ۲-۱۲- اتصال راه‌انداز rd29A به پلاسمید pBI121 حاوی ژن *nptII* ٤۲
شکل ۳-۱- استخراج DNA از آرابیدوپسیس ۵۲
شکل ۳-۲- تکثیر راه‌انداز rd29A توسط آغازگرهای اختصاصی ۵۳
شکل ۳-۳- کلونی‌های رشد کرده بر محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۵۳
شکل ۳-٤- تایید کلون‌های تراریخت حاوی راه‌انداز rd29A با کلونی PCR ۵٤
شکل ۳-۵- استخراج پلاسمید pTZ57R/T حاوی راه‌انداز rd29A از باکتری MC1061 ..... ۵٤
شکل ۳-٦- برش آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T ۵۵
شکل ۳-۷- نتایج همردیف‌سازی راهانداز rd29A به طول ۸۹۹ جفت‌باز در پایگاه داده‌ی NCBI ۵۵
شکل ۳-۸- نتایج همردیف‌سازی راه‌انداز rd29A به طول ۱۲۶۰ جفت‌باز در پایگاه داده‌ی NCBI ۵٦
شکل ۳-۹- تکثیر راه‌انداز rd29A توسط آغازگرهای اختصاصی و برش آنزیمی با آنزیم‌های *BamH*I و *Hind*III ۵٦
شکل ۳-۱۰- محل قرارگیری راه‌انداز 35S در پلاسمید pBI121 ..... ۵۷
شکل ۳-۱۱- برش آنزیمی پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های *BamH*I و *Hind*III ۵۷
شکل ۳-۱۲- کلون‌های تراریخت باکتری XL1blue حاوی دستواره pBI121:rd29A:*gus* در محیط LB دارای کانامایسین

.....۵۸
شکل۳-۱۳- شکل شماتیک از دستواره pBI121:rd29A:*gus*.....۵۸

دوازده

شکل۳-۱٤- استخراج پلاسمید pBI121 حاوی دستواره pBI121:rd29A:*gus* از باکتری XL1blue ۵۸
شکل۳-۱۵- قطعات حاصل از تکثیر راه‌انداز rd29A در دستواره pBI121:rd29A:*gus*.....۵۹
شکل۳-۱٦- تکثیر از ابتدای راه‌انداز rd29A تا انتهای ژن *gus*.....۵۹
شکل۳-۱۷- محل قرارگیری راه‌انداز rd29A در پلاسمید pBI121 .....٦۰
شکل۳-۱۸- محل قرارگیری ژن *DREB1B* در پلاسمید pBI121.....٦۰
شکل۳-۱۹- برش آنزیمی راه‌انداز rd29A و ژن *DREB1B* در پلاسمید pBI121.....٦۱
شکل۳-۲۰- محل قرارگیری راه‌انداز 35S در دستواره pBI121:35S:*DREB1B* در پلاسمید pBI121.....٦۱
شکل۳-۲۱- محل قرارگیری ژن *gus* در پلاسمید pBI121 .....٦۲
شکل۳-۲۲- برش آنزیمی راه‌انداز 35S و ژن *gus* درپلاسمید pBI121 .....٦۲
شـکل۳-۲۳- کلون‌های تراریخت باکتری XL1blue حاوی دسـتواره pBI121:rd29A:*DREB1B* در محیط LB دارای کانامایسین ٦۳
شکل۳-۲٤- شکل شماتیک از دستواره pBI121:rd29A:*DREB1B* ٦۳
شکل۳-۲۵- استخراج پلاسمید pBI121 حاوی دستواره pBI121-rd29A-*DREB1B* از باکتری XL1blue ٦۳
شکل۳-۲٦- قطعات حاصل از تکثیر ژن *DREB1B* و راه‌انداز rd29A در دستواره pBI121:rd29A:DREB1B ٦٤
شکل۳-۲۷- تکثیر از ابتدای راه‌انداز rd29A تا انتهای ژن *DREB1B* در پلاسمید pBI121 .....٦٤
شکل۳-۲۸- برهمکنش DREB1B(At4g25490) با سایر پروتئین‌های درون‌سلولی ٦۵
شکل۳-۲۹- شبکه cold acclimation ٦٦
شکل۳-۳۰- شبکه response to cold.....٦۷
شکل۳-۳۱- شبکه response to water deprivation ٦۸
شکل۳-۳۲- شبکه co-expression ٦۹
شکل۳-۳۳- شبکه physical intraction.....۷۰
شکل۳-۳٤- شبکه shared protein domains ۷۱
شکل۳-۳۵- پلاسمید pTZ57R/T حاوی راه‌انداز rd29A.....۷۳
شکل۳-۳٦- برش آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T با آنزیم‌های *Nhe*I و *Pme*I ۷۳
شکل۳-۳۷- محل قرارگیری راه‌انداز nos در پلاسمید pBI121.....۷٤
شکل۳-۳۸- برش آنزیمی پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های *Nhe*I و *Pme*I.....۷٤
شـکل۳-۳۹- کلون‌هـای تراریخت باکتری XL1blue حاوی دسـتواره pBI121:rd29A:*nptII* در محیط LB دارای کانامایسین ۷٤
شکل۳-٤۰- نمای شماتیک از دستواره pBI121:rd29A:*nptII* ۷۵
شکل۳-٤۱- استخراج پلاسمید pBI121 حاوی دستواره pBI121-rd29A-*nptII* از باکتری XL1blue.....۷۵
شکل۳-٤۲- قطعات حاصل از تکثیر rd29A در دستواره pBI121:rd29A:*nptII* ۷٦
شکل۳-٤۳- تکثیر از ابتدای راه‌انداز rd29A تا انتهای ژن *nptII* در پلاسمید pBI121 .....۷٦
شکل۳-٤٤- کلون‌های تراریخت شده *A. tumefaciens* با دستواره مورد نظر در محیط LB دارای کانامایسین ۷۷
شکل۳-٤۵- استخراج پلاسمید pBI121 حاوی دستواره مورد نظر از باکتری *A. tumefaciens*.....۷۷

شکل۳-٤٦- قطعات حاصل از تکثیر راه‌انداز rd29A در دستواره مورد نظر ۷۸
۳-٤۷- گیاه بالغ اطلسی ۷۹
۳-٤۸- ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت..... ۷۹

سیزده

شکل۳-٤۹- تشکیل کالوس و جوانه‌زنی از آنها در ریزنمونه‌های برگ..... ۷۹
شکل۳-۵۰- ریشه‌زایی گیاهان تراریخت ۸۰
شکل۳-۵۱- ریشه‌زایی گیاه حاوی دستواره pBI121:rd29A:*nptII* در محیط تحت تنش شوری و کانامایسین..... ۸۰
شکل۳-۵۲- زرد شدن برگها و عدم ریشه‌زایی گیاه شاهد در محیط تحت تنش شوری و کانامایسین ۸۱
شکل۳-۵۳- وجود ریشه‌های کوتاه در گیاه تراریخت دارای دستواره pBI121:nos:*nptII* در محیط تحت تنش شوری و کانامایسین ۸۲
شکل۳-٥٤- توالی راه‌انداز rd29A به طول ۱۲۶۰ جفت‌باز و شناسایی موتیف‌های موجود بر روی آن، با استفاده از نرم‌افزار PlantCARE..... ۸۳
شکل۳-۵۵- توالی ره‌انداز rd29A به طول ۸۹۹ جفتباز و شناسایی موتیف‌های موجود بر روی آن، با استفاده از نرم‌افزار PlantCARE..... ۸٤
شکل۳-۵٦- استخراج DNA کل از اطلسی تراریخت ۸۷
شکل۳-۵۷- تکثیر راه‌انداز rd29A و 35S در گیاه تراریخت ۸۸
شکل۳-۵۸- نتایج واکنش PCR روی نمونه RT گیاهان تراریخت..... ۸۸

فهرست جداول

جدول۱-۱- عناصر هسته راه‌انداز ٤
جدول۱-۲- تنظیم کننده‌های موجود در ناحیه راه‌انداز ٦
جدول۲-۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده ۲۱
جدول۲-۲- ترکیب نمک‌های پرمصرف محیط کشت MS ۲۲
جدول۲-۳- ترکیب نمک‌های کم‌مصرف محیط کشت MS ۲۲
جدول۲-٤- ترکیب ویتامین‌های محیط کشت MS ۲۳
جدول۲-۵- ترکیبات بافر بارگذاری ۲٤
جدول۲-٦- ترکیبات بافر TAE ۲۵
جدول۲-۷- مواد لازم برای انجام واکنش PCR با الگوی DNA ژنومی آرابیدوپسیس ۲۵
جدول۲-۸- شرایط PCR برای تکثیر راه‌انداز rd29A با آغازگرهای اختصاصی ۲٦
جدول۲-۹- مواد لازم برای واکنش اتصال قطعات راه‌انداز rd29A به ناقل pTZ57R/T ۲٦
جدول۲-۱۰- مواد لازم برای بافر SOC ۲۸
جدول۲-۱۱- مواد لازم واکنش هضم آنزیمی پلاسمید حاوی راه‌انداز rd29A ۳۰
جدول۲-۱۲- مواد واکنش اتصال راه‌انداز rd29A به پلاسمید pBI121 ..... ۳٤
جدول۲-۱۳- مواد لازم برای واکنش PCR برای تایید حضور راه‌انداز در پلاسمید pBI121 ..... ۳۵
جدول۲-۱٤- شرایط PCR برای تایید حضور راه‌انداز در پلاسمید pBI121 ..... ۳۵
جدول۲-۱۵- مواد لازم برای انجام واکنش PCR روی نمونه DNA با آغازگرهای *DREB1B*-F و *DREB1B*-R ۳۹
جدول۲-۱٦- شرایط PCR با آغازگرهای *DREB1B*-F و *DREB1B*-R ۳۹
جدول۲-۱۸- مواد لازم برای انجام واکنش PCR روی نمونه DNA با آغازگرهای rd29A-F'1/F'2 و *nptII*-R ٤۳
جدول۲-۱۹- شرایط PCR با آغازگرهای rd29A-F'1/F'2 و *nptII*-R ٤۳
جدول۲-۲۰- مواد مورد نیاز و مقادیر آن برای مرحله اول سنتز cDNA ٤۹
جدول۲-۲۱- مواد مورد نیاز و مقادیر آن برای مرحله دوم سنتز cDNA ٤۹
جدول۲-۲۲- مواد لازم برای انجام واکنش PCR روی نمونه cDNA با آغازگرهای *nptII*-F و *nptII*-R ۵۰
جدول۲-۲۳- شرایط PCR با آغازگرهای *nptII*-F و *nptII*-R ۵۰
جدول۳-۱- اسامی پروتئین‌های مرتبط با DREB1B و کد شناسایی آنها در سایت EXPASY ٦۵
جدول۳-۲- اسامی ژن‌های موجود در شبکه cold acclimation و کد شناسایی آنها در سایت EXPASY ٦۷
جدول۳-۳- اسامی ژن‌های موجود در شبکه response to cold و کد شناسایی آنها در سایت EXPASY ٦۷
جدول۳-٤- اسامی ژن‌های موجود در شبکه response to water deprivation و کد شناسایی آنها در سایت EXPASY ٦۸
جدول۳-۵- اسامی ژن‌های موجود در شبکه co-expression و کد شناسایی آنها در سایت EXPAY ۷۰
جدول۳-٦- اسامی ژن‌های موجود در شبکه physical intraction و کد شناسایی آنها در سایت EXPASY ۷۱
جدول۳-۷- اسامی ژن‌های موجود در شبکه shared protein domains و کد شناسایی آنها در سایت EXPASY ۷۲
جدول۳-۸- عناصر تنظیمی در راه‌انداز rd29A ۸۵

پانزده

چکیده

همکاری مشترک محرک‌های محیطی و عناصر تنظیم کننده (cis-acting elements) موجود در راه‌انداز ژن‌ها، نقش بسزایی در بیان ژن‌ها در شرایط متغیر محیطی دارد. راه‌انداز rd29A، یک راه‌انداز القاشونده(Inducible promoter) با تنش است که استفاده از آن به جای راه‌اندازهای دائمی (Constitutive promoter)، اثرات منفی بر روی رشد و نمو گیاه را به حداقل می‌رساند. در این پژوهش به منظور شناسایی و جداسازی راه‌انداز rd29A از گیاه آرابیدوپسیس، DNA کل از این گیاه استخراج شد. آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی بالادست ژن *rd29A* توسط oligo analyser طراحی و دو ناحیه از راه‌انداز rd29A با طول‌های ۸۹۹ و ۱۲۶۰ جفت‌باز از آرابیدوپسیس جدا و در ناقل pTZ57R همسانه‌سازی گردید. عناصر تنظیم کننده موجود بر روی ایندو توالی توسط پایگاه داده‌ی PlantCARE شناسایی شد. بررسی توالی‌های مورد مطالعه نشان داد که ۱۰۰٪ مشابهت، با راه‌انداز rd29A گزارش شده در پایگاه داده NCBI وجود دارد. به منظور بررسی فعالیت راه‌انداز rd29A در گیاه اطلسی، شش دستواره شامل ژن *gus*، *DREB1B* و *nptII* تحت راه‌انداز القائی rd29A با دو توالی به طول ۸۹۹ و ۱۲۶۰ جفت‌باز در ناقل دوگانه pBI121 تهیه شد. دستواره‌های pBI121:rd29A-1260:*nptII* و pBI121:rd29A-899:*nptII* و همچنین pBI121:nos:*nptII* به عنوان شاهد، توسط باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 به اطلسی منتقل شد. گیاهان تراریخت رشد یافته در محیط حاوی کانامایسن 100mg/ml، تحت تنش شوری (NaCl ۲۰۰ میلی‌مولار) قرار گرفتند و گیاهان متحمل انتخاب شدند. حضور و فعالیت راه‌انداز rd29A در گیاهان تراریخت توسط روش‌های مولکولی، PCR و RT-PCR تایید گردید. القای راه‌انداز rd29A در گیاهان تراریخت منجر به افزایش تحمل به کانامایسین تحت شرایط تنش شوری در مقایسه با گیاه غیر تراریخت شد. نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی و فیزیولوژی راه‌انداز rd29A نشان داد که راه‌انداز rd29A برخلاف راه‌انداز دائمی nos تنها در شرایط تنش در گیاهان تراریخت اطلسی القا می‌گردد. همچنین نتایج فیزیولوژی حاصل از انتقال دستواره‌های pBI121:rd29A:*nptII*، نتایج زیست‌رایانه‌ای مبنی بر بیان بیشتر ژن *nptII* تحت تنش شوری در گیاه تراریخت

حاوی دستواره pBI121:rd29A-1260bp:*nptII* را تأیید کرد. با توجه به اینکه بیان دائمی ژن‌های مقاومت به تنش تحت کنترل راه‌انداز دائمی غالبا مانع از رشد طبیعی گیاهان تراریخت می‌شود، بنابراین راه‌انداز القایی rd29A می‌تواند جایگزین مناسبی برای تراریختی گیاهان متحمل به تنش باشد.

کلمات کلیدی: راه‌انداز القائی rd29A، راه‌انداز nos، عناصر تنظیم کننده، PlantCARE، ژن *gus*، ژن *DREB1B*، ژن *nptII*

فصل اول

مقدمه

۱-۱- پیشگفتار

خشکی، شوری و دمای پایین، سه فاکتور محیطی مهم‌اند که بارآوری گیاه را محدود می‌کنند. تنش‌های کم‌آبی سبب القای پاسخ مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه می‌شوند و موجب تعدیل آسیب به گیاه می‌گردند. در مطالعه ژن‌های القاشونده با تنش‌های کم‌آبی در آرابیدوپسیس، چندین ژن مانند ژن *RD29A*[1]، که در شرایط متغیر محیطی القا می‌شود؛ جداسازی شده است [۸۴]. در سال‌های اخیر، از مهندسی ژنتیک ژن‌های پاسخ دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی برای بهبود تحمل محصولات مختلف به تنش استفاده شده است. عوامل متعددی، الگوی بیان ژن‌ها را در شرایط متغیر محیطی تنظیم کرده و در انتقال و دریافت پیام تنش نقش مهمی ایفا می‌کنند [۱۲]. پژوهش‌های زیادی نشان می‌دهد که همکاری مشترک محرک‌های محیطیو عناصر تنظیمی موجود در راه‌انداز ژن‌ها، نقش بسزایی در بیان ژن‌ها در شرایط متفاوت دارد [۹ و ٦٧].

۱-۲- راه‌انداز و تنظیم بیان ژن

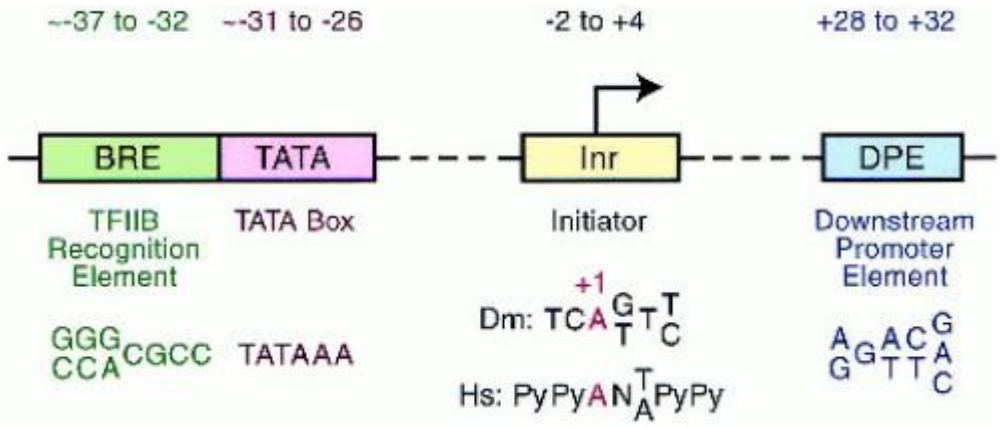
مکانیسم تنظیم رونویسی ژن‌های یوکاریوتی به خوبی پروکاریوت‌ها مشخص نشده است، اما پژوهش‌های زیادی نشان می‌دهد که توالی‌های تنظیمی واقع در راه‌انداز ژن‌های یوکاریوتی، بیان آن‌ها در شرایط متفاوت محیطی کنترل می‌کنند [۷۹]. راه‌انداز ناحیه‌ای است که RNAپلیمراز و فاکتورهای نسخه‌برداری(عمومی و اختصاصی) به هم متصل شده ونسخه‌برداری را آغاز می‌کنند [۱۷،۲۲ و ۴۷]. به

۱.Responsive to Dehydration 29 A

منظور بیان ژن‌های یوکاریوتی، انواعی از پروتئین‌های تنظیمی یا فاکتورهای عمومی نسخه‌برداری با هم همکاری دارند ، علاوه بر این، بیان اختصاصی ژن‌ها مستلزم حضور و فعالیت فاکتورهای اختصاصی نسخه‌برداری در یک ژن به خصوص است [۲۹ و ٦۲].

۱-۲-۱- هسته راه‌انداز

آنالیز هسته راه‌انداز، واکاوی مشارکت اساسی بین مکانیسم‌هایی است که سبب وقوع نسخه‌برداری در یوکاریوت‌ها می‌شوند. همچنین، رویدادهایی که قبل از فرایند نسخه‌برداری رخ می‌دهند، غالبا به سمت کمپلکس نسخه‌برداری در هسته راه‌انداز، هدایت می‌شوند [۶]. در نتیجه، هسته راه‌انداز هدف نهایی همه فاکتورهای فعالی است که در تنظیم نسخه‌برداری به وسیله RNA پلیمراز II مشارکت دارند [۹]. در هر ناحیه از راه‌انداز، توالی‌های حفاظت شده‌ای به‌نام موتیف (Motif) وجود دارد که شامل جعبه TATA، آغازکننده(Inr)[۱]، عنصر شناسایی TFIIB(BRE)[۲]، و عنصر پایین دست هسته راه‌انداز(DPE)[۳] می‌باشند (شکل ۱-۱) و به طور معمول در هسته راه‌اندازها یافت می‌شوند و نیز زمان و مکان شروع ترجمه را به RNAپلیمراز نشان می‌دهند [۳۰].



شکل ۱-۱- عناصر هسته راه‌انداز. تعدادی از موتیف‌های هسته راه‌انداز که می‌توانند در نسخه‌برداری به وسیله RNA پلیمراز II سهیم باشند، ترسیم شده‌اند. هر یک از این عناصر تنها در یک زیرواحد از هسته راه‌اندازهایافت می‌شوند. هر هسته راه-انداز مشخصممکن است شامل تعدادی، همه، یا هیچ‌یک از این موتیف‌ها باشد. BREدر بالا دست هر زیرواحد جعبه TATAقرار دارد. DPE لازمه یک Inr، و دقیقا در موقعیت از ۲۸+ تا ۳۲+ نسبت به نوکلئوتید A_{+1} در Inr است [۹].

مهم‌ترین عنصر تشکیل دهنده‌ی ترکیب شروع نسخه‌برداری، جعبه‌ی TATA با توالی TATA(A/T)A می‌باشد که در ناحیه‌ی ۲۵- تا ۳۰- بالادست نقطه‌ی شروع نسخه‌برداری قرار دارد و توسط پروتئین‌های متصل شونده به جعبه‌یTATA (TBP)[٤]، شناسایی می‌شوند [۱۳ و ۲۷]. در راه‌اندازهای

۱.Initiator
۲.B Recognition Element
۳.Downstream Promoter Element
۴.TATA-binding Protein

فاقد جعبه‌ی TATA، توالی دیگری به‌عنوان جایگاه شـروع‌کننده، جایگزین جعبه‌ی TATA شـده اسـت [۷۶]. دسته‌ی دیگری از نواحی تنظیم کننده که در پایین‌دست راه‌انداز قرار گرفته و فعالیتی مشابه با عناصر بالادستی دارند،DPE هستند. این نواحی دارای توالی (A/G) G (A/T) CGTG در قسمت ۳۰+ از نقطه‌ی شـروع نسـخه‌برداری می‌باشند و در راه‌اندازهای گیاهی گزارش شده‌اند [۷]. عنصر مربوط به مکان شروع رونویسی Inr است که در هسته راه‌اندازهای حاوی TATA نیز یافته شده است و توالی مورد توافق برای آن، در سـلول‌های پسـتانداران Py-Py(C)-A_{+1}-N-T/A-Py-Py و در *Drosophila melanogaster*، T-C-A_{+1}-G/T-T-C/T می‌باشـد. اصـطلاح A_{+1} بر حسـب مکان شـروع ۱+ گماشـته شده است (زیرا مکان رایج در رابطه با شـروع نسخه‌برداری از این نوکلئوتید است) [۱۰ و ۳۳]. BRE مکان اتصال TFIIB است و می‌تواند بدون واسـطه در بالادسـت جعبه TATA، قرار بگیرد. این موتیف، در هردو وضـعیت مثبت و منفی فعالیت دارد و توالی مورد توافق آن، G/C-G/C-G/A-C-G-CC می‌باشد [۱۳] (جدول۱-۱).

جدول۱-۱- عناصر هسته راه‌انداز. توالی مورد توافق، موقعیت (تقریبی) در رابطه با مکان شروع نسخه‌برداری(TSS)[۱]، و

۱.Transcription Start Site

ارگانیسم منطبق با توالی مورد توافق.

	عنصر	توالی مورد توافق	موقعیت	ارگانیسم
Inr	آغازکننده	YYANWYY	۵+ تا ۲-	انسان
		TCAKTY	۴+ تا ۲-	مگس سرکه
TATA	جعبه TATA	TATAWAAR	۲۴+ تا ۳۱-	
BRE_u	عنصر شناسایی TFIIB (بالادست)	SSRCGCC		
BRE_d	عنصر شناسایی TFIIB (پایین‌دست)	RTDKKKK		
DPE	عنصر پایین‌دست راه‌انداز	RGWYVT	۳۳+ تا ۲۸+	مگس سرکه
MTE	عنصر ده موتیف	CSARCSSAAC	۲۷+ تا ۱۸+	مگس سرکه
DCE S1	عنصر هسته‌ای پایین‌دست (زیرواحد یک)	CTTC	۱۱+ تا ۶+	انسان
DCE S2	عنصر هسته‌ای پایین‌دست (زیرواحد دو)	CTGT	۲۱+ تا ۱۶+	انسان
DCE S3	عنصر هسته‌ای پایین‌دست (زیرواحد سه)	AGC	۳۴+ تا ۳۱+	انسان
XCPE1	عنصر هسته X راه‌انداز-۱	DSGYGGRASM	۲+ تا ۸-	انسان

۱-۳- عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به محرک‌های محیطی

مطالعات مولکولی راه‌انداز برخی از ژن‌های گیاهی منجر به شناسایی عناصر تنظیم کننده‌ای[۱] نظیر GT1box(GGTTAA)، Ibox(GATAAAGR)، Gbox(CACGTG) و Hbox(ACCTA(A/C)CA شده که نقش مهمی در دریافت سیگنال‌های نوری و در نتیجه‌ی تنظیم بیان ژن‌های وابسته به نور ایفا می‌کنند. عناصر مذکور در راه‌اندازهای ژن‌های مختلف و گیاهان متفاوتی شناسایی شده‌اند، اما تاکنون

۲.Cis Acting Element