

همساره سازى ژن ها در اسفناج:

همساره سازى نواحى جناحين ناقل هاى پلاستيدى

محمدرضا طراغيس

www.ketab.ir

انتشارات آكادميك

همساره سازى ژن ها در اسفناج:

همساره سازى نواحى جناحين ناقل هاى پلاستيدى

مؤلف، محمدرضا طرافيس

ويراست / نويت / سال چاپ، اول / اول / ۱۳۹۸ - ۲۰۱۹

قطع / صفحه / تيراز، وزيرى / ۸۰ / ۵۰۰

شابک، ۹۷۸-۶۲۲-۶۴۷۵-۱۶-۷ / قيمت، ۳۵۰۰۰ تومان

ناشر: زبان آکادميك

ACADEMIC

سرشناسه محمد رضا طرافيس ۱۳۴۱

عنوان و نام پديدآور: همساره سازى ژن ها در اسفناج، همساره سازى نواحى جناحين ناقل هاى پلاستيدى - محمدرضا طرافيس ۱۳۴۱

مشخصات نشر: زبان آکادميك

مشخصات ظاهري: وزيرى

شابک ۹۷۸-۶۲۲-۶۴۷۵-۱۶-۷

وضعيت فهرست‌نويسى: فيبا

موضوع: اسفناج - ژنتيك - Genetics - Genes

موضوع: ديسه - Plastids

موضوع: كلروپلاست‌ها - تشكيل - Chloroplasts - Formation

رده‌بندي كنگره: SB351

رده‌بندي ديويي: ۶۳۵/۴۱

شماره كتابشناسي ملي: ۵۶۶۶۹۵۱

«حق چاپ براى ناشر محفوظ است. هيچ بخشى از كتاب به هيچ شكل اعم از كيبى، اسكن، هرگونه رسانه اى از جمله كتاب، لوح فشرده،

سايه اينترنتى يا مجلات، بدون اجازه كتبه از ناشر غير قانونى بوده و وجوب جرمه قانونى است.»

نشاني مركز پخش: تيريز، فلكه دانشگاه، برج بلور، انتشارات زبان آكادميك.

تلفن: ۰۴۱۳۳۲۵۱۲۶۶ وبسايه: www.zabanac.com

۷	مقدمه
۱۱	۱. گیاه اسفناج
۱۱	گیاهشناسی اسفناج
۱۲	اهمیت اقتصادی و ارزش غذایی اسفناج
۱۵	۲. پلاستیدها
۱۵	مبدأ پلاستید
۱۶	انواع پلاستیدها
۱۷	ژنوم پلاستید
۱۷	مهندسی ژنتیک کلروپلاست
۲۰	مزیت‌های بیوتکنولوژی کلروپلاست
۲۱	ناقل‌های پلاستییدی
۲۳	۳. توالی‌های تنظیمی
۲۳	ژن نشانگر انتخابی
۲۵	ناقل‌های عمومی
۲۷	۴. بررسی‌های بیوانفورماتیک
۲۷	شناسایی نواحی جناحین و بررسی‌های بیوانفورماتیک
۲۸	طراحی آغازگرهای اختصاصی
۳۱	۵. استخراج DNA کل
۳۲	تهیه ژل الکتروفورز
۳۳	بررسی کمیت و کیفیت DNA کل استخراجی
۳۴	واکنش زنجیره ای پلیمرز
۳۴	برنامه دستگاه PCR

۳۵	خالصسازی DNA از ژل آگارز.....
۳۶	اتصال قطعات تکثیر شده با ناقل همسانه سازی.....
۳۹	۶. فرایند تهیه و آماده سازی.....
۳۹	تهیه و آماده سازی سلول های مستعد باکتریایی.....
۴۰	تراریخته کردن باکتری های مستعد با محصولات واکنش اتصال.....
۴۱	غربالگری.....
۴۱	تایید وجود حامل همسانه سازی یا قطعه درج شده در کلونی های سفید.....
۴۲	روش لیز قلیایی برای خارج کردن پلاسمید.....
۴۴	بررسی حضور اصل همسانه سازی <i>rps7 - ndhB</i> با آنزیم برشی <i>EcoRI</i>
۴۴	استخراج پلاسمید با کیت آزمایشگاهی.....
۴۴	مراحل استخراج با بیت.....
۴۶	مزایای استخراج با بیت.....
۴۶	مزیت های PCR.....
۴۷	۷. نتایج.....
۴۷	شناسایی و تعیین نواحی جناحین.....
۴۸	استخراج DNA کل.....
۴۸	بررسی کمیت و کیفیت DNA کل.....
۴۹	واکنش زنجیره ای پلیمرز.....
۵۰	واکنش اتصال قطعه تکثیر شده با ناقل همسانه سازی pTG19.....
۵۰	تراریختی سلولهای باکتریایی.....
۵۱	تایید حضور قطعه در کلونی های سفید.....
۵۱	از طریق کلونی PCR.....
۵۱	تایید از طریق برش آنزیمی.....
۵۲	توالیابی و بررسی های بیوانفورماتیکی.....

۵۳	 شناسایی آغازگرها در توالی نوکلئوتیدی
۵۴	 همردیفی دادههای پالایش یافته با توالی ثبت شده در NCBI
۵۵	 ترتیب قطعات ژنی در ناحیه همسازسازی شده
۵۷	 منابع
۶۳	 پیوست

www.ketab.ir

مقدمه

گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea*) متعلق به خانواده کینوپودیاسه^۱ می‌باشد و یکی از انواع سبزیجات مهم است و قسمت عمده ترکیبات و فرآورده‌های گیاه اسفناج در ناحیه برگ‌ها است. بخش اعظم ترکیبات پروتئینی گیاه اسفناج در پلاست‌ها است و مهندسی ژنتیکی مسیر ژنوم این گیاه نه تنها برای افزایش پروتئین گیاه اسفناج از مهمترین اهداف محسوب می‌گردد بلکه برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب نیز از اهمیت فوق العاده برخوردار می‌باشد. مصرف گیاه اسفناج در رژیم غذایی بسیار توصیه شده و به عنوان یک سبزی مهم هم بصورت خام و هم بصورت پخته شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. به خاطر رشد سریع و آسان بخش برگی مطالعات زیادی در گیاه اسفناج صورت گرفته است. یکی از این مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی مربوط به کلروپلاست گیاه اسفناج و ژنوم آن می‌باشد. از اهداف اساسی مطالعه کلروپلاست گیاه اسفناج می‌توان به اهداف زیر مرتبط به فتوسنتز در سطح وسیع و ژن‌های درگیر در آن مثل روبیسکو و گیرنده‌های انرژی و انتقال‌دهنده‌های الکترونی اشاره کرد. با توجه به اهمیت این گیاه بیوتکنولوژیست‌های گیاهی علاقه مند به استفاده از این گیاه برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب هستند. برای دستیابی به این هدف انتقال ژن به بخش ژنوم پلاستید الزامی است. برخلاف انتقال ژن به بخش ژنوم هسته‌ای مهندسی ژنتیک پلاستیدی با استفاده از ناقل‌های اختصاصی انجام می‌گیرد. این ناقل‌های اختصاصی دارای دو ناحیه تحت عنوان نواحی جناحین هستند که ژن‌های انتقالی را دربر می‌گیرند. این نواحی بایستی از ژنوم پلاستیدی گیاه اسفناج همسانه سازی بشوند. تنها با

^۱ -Chenopodiace

این دو ناحیه است که پدیده نو ترکیبی همتا بین ژنوم پلاستیدی و ناقل ها اتفاق می افتد. این روش یکی از دقیق ترین روش های متداول و هدایت شده در مهندسی ژنتیک می باشد (Scotti et al., 2012).

برای ساخت ناقل های تراریختی ابتدا باید محل استقرار و قرارگیری ژن های انتقالی در ژنوم را مشخص کرده و بعد از آن همسانه سازی نواحی جناحین صورت گیرد و برای این کار یعنی شناسایی دقیق و اختصاصی نواحی درج ژن ها ابتدا باید ژنوم توالی یابی شده کلروپلاست گیاه مورد نظر در اختیار باشد (Timme et al., 2007). در این تحقیق، با استفاده از اطلاعات نوکلئوتیدی مربوط به توالی ژنوم کلروپلاستی اسفناج پرکاربردترین ناحیه برگ ها، *rps7* از گیاه اسفناج برگه گرفته شد. *ndhB* -

دستکاری ژنتیکی در اندام های پلاستیدی گیاهان برای اهداف گوناگون دارای اهمیت خاصی است. از مهمترین این اهداف میتوان به ایجاد صفات جدید زراعی و باغی، مقاومت در برابر تنش های زیستی و غیر زیستی، تولید پروتئین های نو ترکیب از طریق سیستم اپران و مهندسی متابولیت اشاره کرد. تولید ناقل های اختصاصی اولین گام مهندسی پلاستیدی بشمار می آید. اختصاصی بودن این ناقلها به خاطر وجود قطعات ژنوم کلروپلاستی در این ناقلهاست. این قطعات بنا بر نواحی جناحین معروفند که برای رخداد نو ترکیبی همتا مورد نیاز هستند. در این تحقیق با توجه به گزارش های مکرر از گیاهان دیگر ناحیه *rps7-ndhB* از گیاه اسفناج انتخاب گردید. برای همسانه سازی این نواحی از روش PCR استفاده شد. بدین منظور آغازگرهای اختصاصی این ناحیه توسط نرم افزار Primerblast طراحی شد. برای همسانه سازی این نواحی DNA کل از برگ های جوان گیاه اسفناج با روش CTAB استخراج گردید، سپس ناحیه *rps7-ndhB* از ژنوم کل استخراج شده تکثیر و در وکتور pTG-19 به روش T/A همسانه سازی شد. در این روش از شوک حرارتی سلول های مستعد باکتری های *Ecoli* استفاده گردید. برای تأیید کلونی های تراریخته فرضی از تکنیک کلونی PCR استفاده شد. از کلونی های مثبت اقدام به کشت

نموده و استخراج پلاسمید گردید که درستی پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم برشی EcoRI تأیید شد در نهایت از کلونی مثبت، پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده و برای توالیابی به شرکت Macrogen در کشور کرهجنوبی ارسال گردید. با مطالعات بیوانفورماتیکی معلوم شد قطعه همسانه سازی شده مربوط به ناحیه rps7 -ndhB از اسفناج بوده و از تشابه ۹۶% برخوردار می-باشد فلذا میتوان از این قطعه برای ساخت ناقل اختصاصی اسفناج استفاده نمود.