بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

گروه پژوهشی بیوتکنولوژی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد

کلونینگ ژن Δ15desaturase برای افزایش تولید اسید چرب آلفا لینولنیک اسید (ALA, C18:3) در گیاهان

مرضیه حسنی

استاد راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک

استاد مشاور:

دکتر حمیدرضا صمدلوئی

شهریور ۱۳۹۴

دانشگاه شاهرود

دانشکده : کشاورزی بسطام

گروه : پژوهشی بیوتکنولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای/ خانم مرضیه حسنی

تحت عنوان: کلونینگ ژن Δ15desaturase برای افزایش تولید اسید چرب آلفا لینولنیک اسید (ALA, C18:3) در گیاهان

در تاریخ ..... توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه ..... مورد پذیرش قرار گرفت.

اساتید راهنما	امضاء	اساتید مشاور	امضاء
نام و نام خانوادگی : دکتر شاهرخ قرنجیک		نام و نام خانوادگی : دکتر حمیدرضاصمدلوئی	

اساتید داور	امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء
نام و نام خانوادگی : دکتر ناصر فرخی		نام و نام خانوادگی : مصطفی حیدری	
نام و نام خانوادگی : دکتر مهدی رضایی			
نام و نام خانوادگی :			
نام و نام خانوادگی :			

تقدیم به

مقدس ترین واژه ها در لغت نامه دلم، مادر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت آن می دانم '

پدرم ' به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا مردانگی سخاوت، سکوت، مهربانیش '

برادر و خواهرم همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم . . . .

تشکر و قدردانی

راز و رمز پویای علم و کشف معانی بدیع و تجلی جلوه های شهودی معرفت کیمیایی است که آسمان علم به برکت سیما و سیرهٔ نورانی نبی مکرم صلی الله علیه و آله و سلم، انسان در بند خاک را به معراج حضور می خواند. و چه خرم علمی که از چشمه ی معارف سیراب شود و چه زیبا دانشی که قبای پرنیانش به عطر و بوی گلستان محمدی معطر شود و چه معماری باشکوهی، بنایی که سنگ هویت و فرهنگ آن ریشه در مدینه النبی بیابد. و امروز کاخ آباد علم به سروش معنوی و مفهوم پیام او بیش از پیش محتاج راهنمایانی است که علاوه بر حفظ آبادانی آن در راه اعتلای آن به فرزندان خویش محبت نمایند.

از اساتید راهنما جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک که همیشه مورد لطف و مرحمت ایشان بوده ام و اجرای این پایان نامه بدون راهنمایی ها و مساعدت های ایشان میسر نبود و بدون شک رفتار ایشان چراغ راهنمای اینجانب در تمام مراحل زندگی خواهد بود تشکر و سپاسگزاری می نمایم. از استاد مشاور جناب آقای دکتر حمیدرضا صمدلوئی به خاطر کمک های فکری و راهنمایی های ارزنده ایشان قدردانی می نمایم.

از اساتید داور جناب دکتر ناصر فرخی و جناب دکتر مهدی رضایی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ همچنین جناب آقای دکتر مصطفی حیدری نماینده تحصیلات تکمیلی کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

از کلیه دوستان و دیگر عزیزانی که مراد انجام این پایان نامه یاری نمودند نهایت تشکر و قدردانی را دارم و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

تعهد نامه

اینجانب مرضیه حسنی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه کلونینگ ژن Δ15desaturase برای افزایش تولید اسید چرب آلفا لینولنیک اسید (ALA; C18:3) در گیاهان تحت راهنمائی دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « Shahrood University of» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

آلفالینولنیک اسید به عنوان یک اسید چرب اشباع نشده مهم متعلق به خانواده امگا۳ است که در انسان تولید نمی‌شود و از این رو باید به عنوان بخشی از رژیم غذایی برای حفظ سلامت انسان در نظر گرفته شود. منبع اصلی تامین این گروه از اسیدهای چرب ماهی‌ها می‌باشند که به دلیل وجود آلودگی‌های موجود در زیست بوم ماهیان، تولید گیاهان دانه روغنی با توانایی تولید اسید چرب امگا۳ بالا می‌تواند منبع ارزان و ارزشمندی را در اختیار قرار دهد. هدف از این مطالعه همسانه‌سازی ژن دلتا۱۵ دسچوراز (*Δ15desaturase*) جهت انتقال به گیاهان روغنی به منظور افزایش محتوای آلفالینولنیک اسید به عنوان پیش‌ساز اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر می‌باشد. بدین منظور جهت خالص‌سازی و تکثیر ژن *دلتا۱۵دسچوراز* ابتدا RNA کل از سلول‌های مخمر *پیکیاپاستوریس* استخراج و cDNA سنتز شد. ژن *دلتا۱۵دسچوراز* توسط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی تکثیر و در ناقل *pTZ57R/T* در باکتری *اشرشیا کولی* کلون شد. پس از انتخاب کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و انجام کلونی PCR کلون‌های مثبت انتخاب شدند. هضم توسط آنزیم‌های برشی *Xba*I و*Sac*I و توالی یابی قطعه کلون شده، وجود ژن در ناقل همسانه‌سازی تایید کرد. سپس این سازه ژنی در ناقل نوترکیب *pKS* حاوی پروموتر ناپین ویژه بذر کلون گردید. برش آنزیمی با آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I انجام و قطعه‌ی ژن مورد نظر از ناقل جدا و درون ناقل *pBI121* قرار گرفت و سپس در باکتری *اشرشیا کولی* کلون گردید. کلون‌های رشد یافته در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین گزینش و یکپارچگی سازه حاوی ژن *دلتا۱۵دسچوراز* و پروموتر ناپین توسط انجام کلونی PCR تایید شد. پلاسمید نوترکیب حاصل به *اگروباکتریوم* انتقال داده شد. پس از هم‌کشتی *با اگروباکتریوم* جهت تراریزش گیاه توتون، رشد ریزنمونه‌های گیاه توتون در محیط انتخابی حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین و سفوتاکسیم

تراریختی انها را تایید نمود. واکنش PCR تراریخت بودن گیاهان توتون را هم در سطح DNA تاییـد نمـود.

کلمات کلیدی: آنزیم دلتا۱۵دسچوراز،آلفالینولنیک اسید، مخمر پیکیاپاسـتوریس، پرومـوتر نـاپین، اسید چرب، انتقال ژن به گیاه توتون

لیست مقاله‌های مستخرج از پایان‌نامه

۱) کلونینگ ژن *Δ15desaturase* برای افزایش تولید اسید چرب آلفا لینولنیک اسید (ALA; C18:3) در گیاهان، اولین همایش بین‌المللی و نهمین همایش ملی ایران،تهران، ۱۳۹۴/۳/۳

۲) بررسی ساختار پروتئینی ژن *Δ15Desaturase* استخراج شده از مخمر *Pichia pastoris*، دومین همایش ملی فناوری‌های نوین در کشاورزی و منابع طبیعی، رشت، ۱۳۹۴/۶/۴

فصل اول مقدمه و کلیات

۱-۱ بیوتکنولوژی گیاهی ۱

۱-۲ انتقال ژن ۱

۱-۲-۱ روش‌های انتقال ژن ۲

۱-۳ اسیدهای چرب ۴

۱-۴ اسیدهای چرب غیر اشباع ۸

۱-۴-۱ اسیدهای چرب امگا۶ ..... ۸

۱-۴-۲ اسیدهای چرب امگا۳ ..... ۸

۱-۵ اسیدهای چرب ضروری ۱۰

۱-۶ نقش بیولوژیکی اسیدهای چرب ۱۱

۱-۷ مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب ۱۵

۱-۸ مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع ۱۷

۱-۹ آنزیم‌های دسچوراز ۲۱

۱-۱۰ بیوسنتز اسیدهای چرب در مخمرها ۲۳

۱-۱۱ ضرورت انجام تحقیق ۲۵

فصل دوم مروری بر منابع

۲-۱ بازسازی مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع در مخمرها و گیاهان تراریخته ۳۰

۲-۲ تولید اسیدهای چرب غیر اشباع نوترکیب در گیاهان تراریخته ۳۲
۲-۳ بررسی بیان ژن‌های دسچوراز در سطح RNA ۳۶

فصل سوم مواد و روش‌ها

۳-۱ مواد شیمیایی ۴۰
۳-۲ تجهیزات مورد استفاده ۴۰
۳-۳ میکروارگانیسم‌ها ۴۱
۳-۴ ناقلین مورد استفاده ۴۱
۳-۵ طراحی آغازگرهای اختصاصی و داخلی ۴۴
۳-۶ کشت مخمر *پیکیاپاستوریس* ۴۵
۳-۶-۱ استخراج DNA ژنومی از *پیکیاپاستوریس* ۴۵
۳-۷ واکنش زنجیرهای پلیمراز جهت تکثیر ژن *Δ15de* ۴۷
۳-۷-۱ الگوی دمای واکنش زنجیرهای پلیمراز ۴۸
۳-۸ استخراج RNA ۴۸
۳-۸-۱ بررسی کمیت و کفیت DNA و RNA استخراجی ۴۹
۳-۸-۲ الکتروفورز ژل آگاروز با دستگاه الکتروفورز افقی ۴۹
۳-۸-۳ تعیین کمیت و کیفیت RNA ۵۰
۳-۹ تیمار باDNaseI برای حذف آلودگی DNA ۵۰
۳-۹-۱ سنتز cDNA ۵۰
۳-۹-۲ واکنش زنجیرهای پلیمراز جهت تکثیر ژن *دلتا۱۵دسچوراز* از روی cDNA ۵۱

۳-۹-۳ انجام الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز و جداسازی قطعه تکثیری از روی ژل ۵۱
۳-۱۰ الحاق ژن *Δ15de* به درون ناقل *PTZ57R/T* ۵۲
۳-۱۰-۱ تهیه سلول‌های مستعد در شرایط استریل ۵۳
۳-۱۰-۲ تراریختی سلول‌های مستعد باکتری *E.coli* ۵۳
۳-۱۰-۳ استخراج پلاسمید ۵۴
۳-۱۰-۴ هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I ۵۵
۳-۱۱ الحاق ژن به درون ناقل *pBluescript II ks(+)* حاوی پروموتر *Napin* ۵۵
۳-۱۱-۱ اتصال سازه به ناقل *PKS* حاوی ژن *Napin* ۵۶
۳-۱۲ آماده سازی ناقل گیاهی ۵۷
۳-۱۳ انتقال کاست ژنی *Nap+ Δ15de* برش خورده به ناقل *pBI121* ۵۷
۳-۱۳-۱ انتقال سازه نوترکیب به باکتری *E.coli* ۵۹
۳-۱۳-۲ انتقال سازه نوترکیب به آگروباکتریوم ۵۹
۳-۱۴ تهیه محیط کشت گیاهی MS ۶۱
۳-۱۴-۱ ضد عفونی و کشت توتون ۶۱
۳-۱۴-۲ تهیه ریزنمونه ۶۳
۳-۱۴-۳ تراریزش توتون با استفاده از *آگروباکتریوم* ۶۳
۳-۱۴-۴ استخراج DNA ژنومی از گیاهان تراریخته احتمالی ۶۵
۳-۱۴-۵ استخراج RNA ۶۵
۳-۱۴-۶ سنتز cDNA ۶۵

۳-۱۴-۷ انجام واکنش PCR برای DNA و cDNA گیاه تراریخت احتمالی حاوی سازه ژنی *Napin + Δ15de* ۶۵

۳-۱۵ بررسی بیوانفورماتیکی ژن *Δ15de* ۶۶

فصل چهارم نتایج و بحث

۴-۱ بررسی نتایج استخراج DNA و RNA ۶۸

۴-۱-۱ بررسی نتایج حضور ژن *دلتا۱۵دسچوراز* از DNA استخراج شده ۶۸

۴-۲ بررسی نتایج تکثیر ژن *Δ15de* با استفاده از cDNA سنتز شده ۶۹

۴-۳ غربالگری کلون‌های حاوی سازه نوترکیب *pTZ57R/T : Δ15de* ۷۰

۴-۳-۱ تایید حضور ژن *Δ15de* در ناقل *pTZ57R/T* با انجام کلونی PCR ۷۱

۴-۳-۲ تایید سازه از طریق توالی‌یابی ۷۱

۴-۴ Exepasy translate ۷۳

۴-۴-۱ ProtParam ۷۳

۴-۴-۲ TMHMM ۷۴

۴-۴-۳ SignalP ۷۵

۴-۵ Psipreid ۷۶

۴-۵-۱ Sopma ۷۸

۴-۶– بررسی دومین ژن *Δ15de* به کمک سایت pfam ۷۹

۴-۶-۱ بررسی درختچه فیلوژنتیکی ۸۱

۴-۶-۲ نتیجه هضم آنزیمی *pTZ57R/T* با دو آنزیم *Sac*I و *Xba*I ۸۳

۴-۷ غربالگری کلون‌های حاوی سازه نوترکیب *pKS:Napin + Δ15de* ۸۴

۴-۷-۱ تایید کلونی‌های نوترکیب حاوی سازه ژنی *pks: Napin + Δ15de* با انجام کلونی PCR... ۸۵

۴-۷-۱ تایید سازه از طریق هضم آنزیمی توسط دو آنزیم برشی *Hind*III و *Sac*I..... ۸۶

۴-۸ غربالگری کلون‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب*pBI121 در باکتری E.coli*..... ۸۷

۴-۸-۱ تایید کلون‌های *E.coli* حاوی پلاسمید نوترکیب با انجام کلونیPCR ۸۸

۴-۸-۲ بررسی حضور سازه ژنی از طریق هضم آنزیمی با دو آنزیم *Hind*III و *Sac*I ۸۸

۴-۹ غربالگری کلون‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب *pBI121: Napin+ Δ15de* در آگروباکتریوم ۸۹

۴-۹-۱ تایید کلون‌های آگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر با انجام کلونیPCR ۹۰

۴-۱۰ انتقال آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی *pBI121*: *Napin+ Δ15de* به گیاه توتون ۹۱

۴-۱۱ تایید DNA و cDNA بدست آمده از توتون تراریخت احتمالی ۹۲

۴-۱۲ بحث و پیشنهادات ۹۳

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱بیوتکنولوژی گیاهی

بیوتکنولوژی گیاهی فرآیند تولید گیاهانی با تغییرات ژنتیکی است که این تغییرات با استفاده از تکنولوژی DNAی نوترکیب انجام می‌شود. بیوتکنولوژی گیاهی به طور عمده شامل وارد کردن ژن-های خارجی به گونه‌های گیاهی تجاری است که منجر به اصلاح محصولات زراعی و تولید فرآورده-های جدید در این گیاهان می‌شود. امروزه، از بیوتکنولوژی به عنوان یک ابزار برای اعطای صفات جدیدی، که برای تولیدات کشاورزی، محیط زیست، تغذیه و سلامت بشر سودمند هستند، استفاده می‌شود. بیوتکنولوژی گیاهی به دو حوزه کشت بافت گیاهی و مهندسی ژنتیک گیاهی محدود می-شود. یک محصول تراریخته حاوی ژن یا ژن‌هایی است که، به جای آنکه گیاه آن‌ها را از طریق گرده افشانی و تلاقی کسب کند، با استفاده از مهندسی ژنتیک به صورت مصنوعی دریافت می‌کند. توالی ژن داخل شده (که به آن ترانسژن گویند) می‌تواند از گیاه غیر خویشاوند دیگری و یا حتی گونه‌ای کاملا متفاوت باشد. به عنوان مثال در ذرت تراریختهBt، که آفت کش را خود تولید می‌کند، حاوی ژنی از باکتری *باسیلوس تورینجینسیس* است. گیاهان حاوی ترانسژن غالبا محصولات تغییر یافته ژنتیکی[1] یا GM نامیده می‌شوند (۳).

۱-۲ انتقال ژن

انتقال ژن به سلول‌های گیاهی و کشت بافت امکان انتقال ژن‌های با صفات مطلوب به گیاهان میزبان را فراهم و باعث ایجاد گیاهان تراریخت با صفات بهبود یافته، شده است. این روش پتانسیل بسیار زیادی در بهبود ژنتیکی محصولات گیاهان مختلف با ادغام در برنامه‌های بیوتکنولوژی گیاهی و تولید و تکثیر آنها دارد. این تکنیک نقش امیدوارکننده‌ای برای معرفی صفات مهم زراعی مانند افزایش عملکرد، کیفیت بهتر و افزایش مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها را دارد.

1 - genetically modified (GM) crops

۱-۲-۱روش‌های انتقال ژن

بسیاری از روش‌های مورد استفاده در بیوتکنولوژی گیاهی را می‌توان تحت عنوان کشت بافت گیاهی و مهندسی ژنتیک گیاهی دسته‌بندی نمود. یک مشکل کار با گیاهان این است که گیاهان دارای دیواره سلولی هستند و بنابراین باید راهی پیدا کرد تا پلاسمید نوترکیب را از این مانع عبور داد. برخی از روش‌های مورد استفاده به این منظور عبارتند از: ریز تزریقی به سلول‌های منفرد، انتقال به روش بیولیستیک: که در این روش تفنگ ژنی یا بیولیستیک، که ترکیبی از علم بیولوژی و بالستیک می‌باشد، ذرات ریز میکروسکوپی از جنس طلا با ژن مورد نظر پوشانده می‌شوند و به کمک یک پالس هلیوم به داخل سلول‌گیاهی شلیک می‌گردند. در داخل سلول قطعه ژن از روی ذره جدا و به داخل ژنوم سلول تلفیق می‌گردد. الکتروپوراسیون سلول‌های رشد یافته بدون دیواره سلولی(پروتوپلاست): الکتروپوراسیون عبارت از مخلوط نمودن ژن دلخواه با پروتوپلاست‌های سلول گیاهی و سپس ایجاد منافذ ریزی در سلول به کمک پالس‌های الکتریکی، به طوریکه DNA بتواند از آنها عبور نموده و وارد سلول گردد. متعاقبا ژن مورد نظر به عنوان قسمتی از ژنوم گیاهی در آمده و سلول نیز قادر است منافذ را ترمیم نماید. امتزاج پروتوپلاست‌ها (کشت بافت گیاهی): کشت بافت گیاهی عبارت از کشت سلول‌ها یا بافت‌های گیاهی روی محیط غنی‌شده با فرمول‌های خاص می‌باشد. تحت شرایط مطلوب، هر سلول منفرد گیاهی می‌تواند به یک گیاه کامل باززایی شود. این پدیده امکان تولید سریع انبوهی از گیاهان کاملا مشابه را فراهم می‌آورد. پروتوپلاست، یک سلول گیاهی بدون دیواره سلولزی است. پروتوپلاست‌ها قادرند با یکدیگر ترکیب شوند و حتی در گیاهانی که از لحاظ ژنتیکی ناسازگار هستند هیبریدهای سوماتیکی تولید نمایند. پروتوپلاست‌های هیبرید سپس از طریق کشت بافت به صورت گیاهان هیبرید کامل باززا می‌شوند. به عنوان مثال گیاه بوکوفلاور یک هیبرید سوماتیکی است که حاصل دو رگ‌گیری بین کلم بروکلی و کلم گل می‌باشد. روش دیسک برگی: سلول‌های گال طوقه دو ویژگی را کسب می‌کنند که سلول‌های عادی فاقد آن هستند. این دو خصوصیت یکی از توانایی رشد

در محیط‌های عاری از هورمون خارجی و دیگری تولید ترکیبات غیر عادی با اوپین‌ها می‌باشد. اوپین‌ها به عنوان منابع کربن و نیتروژن توسط باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. به این ترتیب باکتری در محیط گال طوقه یک محیط غذایی مناسب را برای رشد ایجاد می‌کند. اساس مولکولی بیماری گال طوقه در سال ۱۹۷۴ با کشف یک پلاسمید ۲۰۰کیلو بازی به نام پلاسمید T کشف گردید. حذف این پلاسمید سبب غیربیماریزا شدن باکتری و انتقال آن سبب بازگشت خاصیت بیماریزایی می‌گردد. این پلاسمید می‌تواند با کمک ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک و یا ژن-های حامل ویژگی‌های زراعی مفید مانند تحمل به علف‌کش، مقاومت به ویروس‌ها و حشرات، ساخته شود. یک یافته مهم در مورد پلاسمید T این است که قطعه‌ای به طول ۱۳کیلوباز از آن به داخل سلول پذیرنده منتقل می‌شود. انتقال این قطعه که T-DNA نامیده می‌شود به سلول‌های گیاهی مرحله کلیدی در استفاده از *آگروباکتریوم تومفاشینس*[1] به عنوان عامل تراریختی مستقیم و دستورزی‌های ژنتیکی در گیاهان عالی می‌باشد. پلاسمید این باکتری به عنوان ابزاری ایده‌ال برای انتقال DNA عمل می‌کند. به طوریکه تاکنون شمار رو به افزایشی از گونه‌های گیاهی با استفاده از این‌گونه ناقلین پلاسمیدی به گونه‌ای موفقیت آمیز با ژن‌های خارجی تراریخت شده‌اند. این عمل غالبا از طریق کشت قطعات کوچک برگ در محیط حاوی آگروباکتریوم‌های دستورزی شده ژنتیکی انجام می‌شود. محدودیت اصلی این روش این است که آگروباکتریوم نمی‌تواند روی گیاهان تک‌لپه مثل ذرت عمل کند اما به راحتی قادر است گیاهان دولپه‌ای مانند گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و سویا را آلوده سازد (۳).

۱-۲-۱-۱ انتقال به کمک آگروباکتریوم

روش تراریختی مبتنی بر آگروباکتریوم[2] شامل خلع سلاح باکتری قرار دادن ژن‌های جدید به

1 - Agrobacterium tumefaciens
2- Agrobacterium

داخل آن و استفاده از باکتری به منظور انتقال ژن‌های دلخواه به ژنوم گیاهی می‌باشد. آگروباکتریوم یک باکتری خاکزی است که از طریق انتقال بخشی از ماده ژنتیکی (DNA) خود به گیاهان میزبان سبب ایجاد بیماری گال طوقه می‌گردد. DNA انتقال یافته (که به آن T-DNA گفته می‌شود) به طور پایدار در ژنوم گیاه تلفیق می‌گردد. بیان ژن‌های موجود در این قطعه باعث تولید هورمون‌های گیاهی شده و در نهایت رشد توموری سلول‌ها را سبب می‌گردد. پس از کشف این پدیده، دانشمندان توانستند با خلع سلاح باکتری و قرار دادن ژن‌های جدید به داخل آن، از این باکتری برای انتقال بی‌خطر ژن‌های دلخواه به ژنوم گیاهان استفاده نمایند. انتقال ژن به واسطه‌ی آگروباکتریوم در مقایسه با روش‌های مکانیکی بمباران ذرات دارای مزیت‌های بسیاری است که از جمله آن‌ها انتقال یک قطعه DNA با توالی‌های مشخص در دو انتها، تعداد نسخه کم از تراژن و نیز امکان انتقال قطعات بزرگ DNA است. موفقیت این روش به نوع و سن بافت گیاهی برای آلودگی، نوع ناقل استفاده شده برای انتقال ژن، سویه‌ی آگروباکتریوم، مراحل و جزئیات عمل آلودگی به خصوص استفاده از ترکیب فنولی استوسرینگون وابسته است (۲۲). روش دیگر استفاده از آگروباکتریوم در انتقال ژن گیاهان، روش درون بوته[1] است که بدین منظور از آگروباکتریوم در شرایط in vivo برای تلقیح بذور در حال جوانه‌زنی استفاده می‌شود و نیازی به کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی وجود ندارد. با استفاده از روش in planta تنوع سوماکلونال به حداقل رسیده و به طور قابل توجهی در زمان، هزینه‌ها و مراحل طولانی کشت بافت صرفه‌جویی می‌شود (۲۴) . این روش برای گیاهان تک لپه‌ای مانند برنج و گندم که از دیدگاه کشت بافت و باززایی سرسخت هستند بسیار مفید بوده و می‌تواند جایگزین روش کشت بافت شود. این روش در غلاتی مانند برنج، گندم و ذرت گزارش شده است (۱۹،۲۲،۷۰،۷۶،۸۱،۸۲).

1 - in plant

۱-۳ اسیدهای چرب

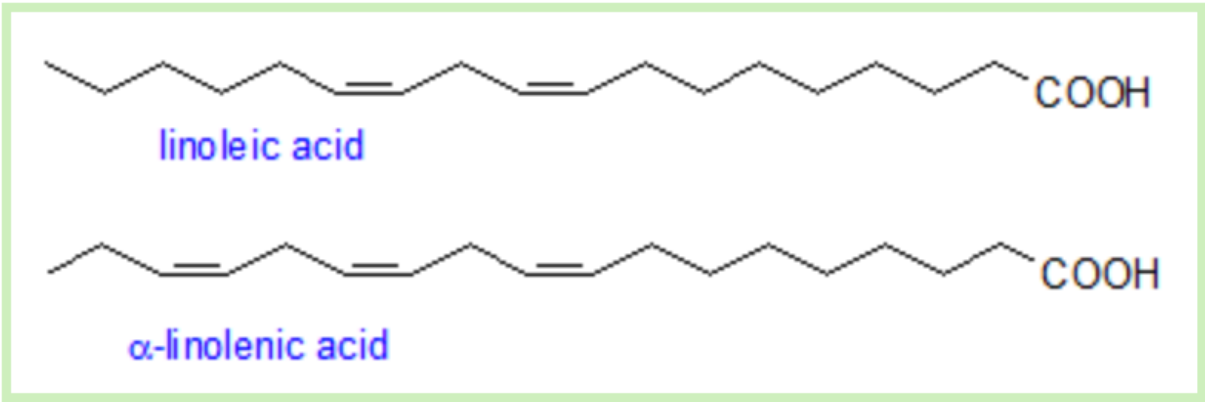
در سال‌های اخیر با وجود نگرانی‌های مربوط به آلودگی در محیط زیست دریایی تحقیقات به سمت یک منبع پایدار و جایگزین مناسب برای اسیدهای چرب توسعه پیدا کرده است. به عنوان مثال یکسری از نتایج نشان می‌دهدکه، در چندین دهه گذشته فعالیت بیوسنتزی بسیاری از ژن‌های کد کننده اسیدهای چرب غیر اشباع شناسایی و مشخص شده‌اند. این انتقال ژن اجازه بازسازی مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیر اشباع را در محصولات دانه روغنی داده است، و کمک به تولید گیاهان تراریخت مهندسی شده برای تولید و ذخیره‌سازی سطوحی از این اسیدهای چرب امگا۳ غیر اشباع در دانه‌های روغنی نزدیک به سطوح تولیدی این اسیدهای چرب در موجودات دریایی بومی شده است (۱۲). اسیدهای چرب، هیدروکربن‌های با زنجیره بلند هستند که یک گروه کربوکسیل در ابتدای زنجیره آن‌ها قرار گرفته است و در اثر استری شدن گلیسیرول‌ها ایجاد می‌شوند، که اجزای اصلی تشکیل دهنده روغن‌ها و چربی‌ها هستند. تقریبا اسیدهای چرب به طور کامل زنجیره‌ای خطی از اسیدهای کربوکسیلیک آلیفاتیک می‌باشند. اسیدهای چرب دارای دو پایانه می‌باشند، پایانه اسید کربوکسیلیک (-COOH) که در ابتدای زنجیره قرار دارد و آلفا نامیده می‌شود و پایانه متیل (CH3)، که در دم آلیفاتیک در نظر گرفته شده و بنابراین به آن امگا گویند. در نامگذاری اسیدچرب محل اولین پیوند دوگانه تعیین می‌کند که شمارش از انتهای متیل، که همان پایانه امگا یا پایانه N است صورت پذیرد. در بیوشیمی، یک اسید چرب کربوکسیلیک با دم بلند آلیفاتیک (زنجیره)، اشباع[1] یا غیراشباع[2] است. به طور طبیعی اسیدهای چرب یک زنجیره از ۱۲ کربن تا ۲۸کربن (C_{12}-C_{28}) تشکیل شده‌اند. اسیدهای چرب معمولا از تری‌گلیسریدها یا فسفولیپیدها مشتق می‌شوند. وقتی که به مولکول‌های دیگر متصل نباشند، به عنوان اسیدهای چرب آزاد شناخته می‌شوند. اسیدهای چرب از منابع مهم انرژی محسوب می‌شوند، بدلیل اینکه وقتی متابولیزه می‌شوند، بیشترین مقدار محصول

1 - Saturation
2 - Unsaturated

تولیدیشان ATP[1] است (۴۶). اسیدهای چربی که دارای پیوندهای دوگانه کربن – کربن هستند به عنوان اسیدهای چرب غیراشباع[2] شناخته شده‌اند. اسیدهای چرب بدون پیوند دوگانه را اسیدهای چرب اشباع[3] می‌نامند. این دو نوع اسید چرب همچنین از نظر طول زنجیره اسید چرب نیز متفاوت هستند. اسیدهای چرب از نظر طول زنجیره به چند دسته تقسیم می‌شوند که عبارتند از: اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه[4](SCFA) اسیدهای چربی هستند که دم آلیفاتیک آن‌ها از ۶ کربن تشکیل شده است. اسیدهای چرب با طول زنجیره متوسط[5](MCFA) اسیدهای چربی که دارای زنجیره‌ای با ۱۲-۶ کربن هستند. اسیدهای چرب با زنجیره بلند[6](LCFA) دم آلیفاتیک این گروه از ۲۱-۱۳ کربن تشکیل شده است و اسیدهای چرب با طول زنجیره بسیار بلند[7](VLCFA) این اسیدهای چرب با دنباله‌های آلیفاتیک بلندتر از ۲۲ کربن هستند. در نامگذاری سیستماتیک اسیدهای چرب غیر اشباع پس از ذکر تعداد کربن و تعداد پیوند دوگانه پسوند enoic acid– اضافه می‌گردد. با استفاده از سیستم دلتا (Δ) محل پیوندهای دوگانه را نیز می‌توان مشخص کرد. برای اینکار ابتدا کربن‌های اسید چرب از طرف کربن گروه کربوکسیل شماره گذاری می‌گردند. سپس محل پیوندهای دوگانه مشخص می‌گردد. از این جمله می‌توان به دو خانواده اصلی اسیدهای چرب اشباع نشده لینولئیک اسید[8] ((C18:2) -octadecadienoicacid ,*Cis*-Δ^{9},Δ^{12}) و آلفالینولنیک اسید[9](*Cis* $\Delta^{9},\Delta^{12},\Delta^{15}$,-octadecatrienoic) در طبیعت اشاره نمود (شکل (۱-۱)) (۴۶). بسیاری از اسیدهای چرب طبیعی دارای ۱۸ کربن می‌باشند. اکثر محصولات روغنی حاوی اسیدهای چرب با طول زنجیره‌ای ما بین C_{16} وC_{22} می‌باشند. در اکثر روغن‌های گیاهی غالبا اسیدهای چرب C_{18} دیده می‌شوند. هسته خرما و نارگیل، منابع اسیدهای

1 - Adenosine triphosphate (ATP)
2 - Polyunsaturated fatty acids (PUFA)
3 - Saturated fatty acids (SFA)
4 - Short chain fatty acids (SCFA)
5 - Medium chain fatty acids (MCFA)
6 - Long-chain fatty acids (LCFA)
7 - Very long chain fatty acids (VLCFA)
8 - Linoleic acid (LA)
9 - Alpha-linolenic acid (ALA)

چرب با زنجیره متوسط هستند، که روغن موجود در آن‌ها بصورت اسید لوریک[1] می‌باشد. در گیاهان عالی، تعداد پیوندهای دوگانه در اسیدهای چرب به ندرت به بیش از سه پیوند می‌رسد، اما در جلبک-ها و حیوانات می‌تواند تا شش پیوند برسد.



شکل ۱-۱ ساختار آلیفاتیک اسید لینولئیک و آلفالینولنیک اسید، و محل قرار گیری پیوندهای دوگانه در طول زنجیره اسید چرب (http://www.gbhealthwatch.com)

چربی‌های حیوانی دارای طیف وسیعی از اسیدهای چرب بلند زنجیر هستند، همانند انوع مختلی از اسیدهای اوریک‌ها، به عنوان مثال گونه‌های مختلف شلغم روغنی، غنی از C_{22} مونوانوئیک اسید است. پتانسیل محصولات روغنی جدید که با غیر اشباعیت غیر معمول و یا عملکردهای فراوان در حال توسعه هستند. امروزه مجموعه‌ای ازترکیبات اسیدهای چرب موجود در روغن‌ها و چربی‌ها و اسیدهای چرب عمومی و نادر در دسترس می‌باشد (۲۳،۳۱). منابع طبیعی چربی‌ها شامل گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها هستند. روغن گیاهان (به عنوان مثال، روغن زیتون، روغن آفتابگردان) و حیوانات (مانند کره، گوشت گاو) همیشه در زندگی انسان بعنوان تامین کننده منابع متعدد برای متابولیسم دخیل می‌باشند. بیشترین کاربرد این اسیدهای چرب در تغذیه می‌باشد ولی به عنوان مواد اولیه در فرایندهای صنعتی نیز کاربرد دارند (۱،۶). در حال حاضر روغن‌های گیاهی، اکثر روغن‌ها و چربی‌های مصرفی در جهان را به طور طبیعی به خود اختصاص داده‌اند. طبق گزارش فاو در حدود ۱۵۰ میلیون تن از روغن‌های گیاهی سالانه مصرف می‌شود و این تعداد در آینده افزایش می‌یابد.

1 - Lauric acid

روغن‌های گیاهی نسبتا کم هزینه بوده و معمولا سالم‌تر از چربی‌های حیوانی به عنوان حاوی مقادیر نسبتا بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع در نظر گرفته می‌شوند (۵،۶). بنابراین، ارزش تغذیه‌ای اسیدهای چرب غیر اشباع در حال حاضر به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است.

۱-۴ اسیدهای چرب غیر اشباع

اسیدهای چرب غیر اشباع(PUFA) اسیدهای چربی هستند که در طول زنجیره خود حداقل دارای یک پیوند دوگانه هستند. این اسیدهای چرب به دو نوع اسید چرب غیراشباع تقسیم می‌شوند که عبارتند از: اسیدهای چرب تک غیراشباعی[1] که دارای یک پیوند دوگانه هستند و چند غیر اشباعی[2] که بیش از یک پیوند دوگانه دارند. اسیدهای چرب چند غیر اشباعی خود به دو دسته اسیدهای چرب امگا[3]۳ و اسیدهای چرب امگا[4]۶ تقسیم می‌شوند (۵۶).

۱-۴-۱ اسیدهای چرب امگا۶

اسیدهای چرب امگا ۶ (به نام‌های ω6 اسید چرب یا n-6 اسید چرب) که یک پیوند دوگانه کربن – کربن در موقعیت انتهایی n-6، متصل به ششمین کربن دارند که از پایانه متیل شمارش می-شود. اسید لینولئیک (18:2, n-6) یک اسید چرب امگا۶ با کوتاهترین زنجیر و یکی از اسیدهای چرب بسیار ضروری است، و جزء اسیدهای چرب ضروری که بدن انسان قادر به سنتز آن نیست طبقه بندی می‌شود. سلول‌های پستانداران فاقد آنزیم امگا۳دسچوراز[5] هستند، بنابراین قادر به تبدیل اسیدهای چرب امگا ۶ به اسیدهای چرب امگا ۳ نمی‌باشند. امگا ۶ پیش‌سازهای ایندوکانابینوئیدها، لیپوکسین‌ها و ایکوزانوئیدهای خاصی هستند. بزرگترین منابع امگا۶ ، تخم مرغ، ماکیان، سبزیجات، روغن ذرت و آفتابگردان هستند (۵۶).

1 - Monounsaturated fatty acids
2 - Polyunsaturated fatty acids(PUFA)
3 - ω3
4 - ω6
5 - ω3desaturase

۱-۴-۲ اسیدهای چرب امگا۳

اسیدهای چرب امگا۳ (به نام‌های ω3 اسید چرب یا n-3 اسیدچرب) اسیدهای چرب چند غیراشباعی هستند که دارای یک پیوند دوگانه (C=C) در سومین اتم کربن انتهایی از زنجیره کربنی هستند. اسیدهای چرب امگا۳ به صورت فزاینده‌ای به عنوان بخش مهمی از رژیم غذایی جهت سلامت و پیشگیری از بیماری به کار گرفته می‌شوند. شمار فزاینده‌ای از مواد غذایی که معمولا منبع اسیدهای چرب امگا۳ به شمار نمی‌روند (مانند محصولات لبنی و نان) را می‌توان با مقادیر کمی از این اسیدهای چرب، غنی کرد. جستجو در مورد مکانیسم‌های مولکولی و سلولی تاثیر اسیدهای چرب امگا۳ بر روی سلامت و بیماری حاکی از آنند که این چربی‌های موجود در رژیم غذایی، فرآیندهای متعددی را تنظیم می‌نمایند، از آن جمله می‌توان نمو مغز و شبکیه چشم، واکنش‌های التهابی را نام برد. سه نوع از اسیدهای چرب امگا۳ مهمی که در فیزیولوژی انسان نقش مهمی دارند عبارتند از: آلفالینولنیک اسید (ALA) (موجود در گیاهان)، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) [1] و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) [2] (موجود در روغن‌های دریایی مانند ماهی). جلبک‌های دریایی و فیتوپلانکتون‌ها از منابع اولیه اسیدهای چرب امگا۳ هستند. روغن‌های گیاهی از بیشترین منابع تولید کننده اسیدهای چرب امگا۳ بویژه آلفالینولنیک اسید هستند که از آن جمله می‌توان به گردو، دانه‌های خوراکی، روغن بذر کتان، کلزا و شاهدانه اشاره نمود. روغن ماهی و تخم مرغ از منابع جانوری هستند که دارای اسیدهای چرب امگا۳ ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) می‌باشند (۵۶).

۱-۵ اسیدهای چرب ضروری

در سال ۱۹۶۳ هانسن و همکاران برای اولین بار نشان دادند که در رژیم غذایی جوامع بشری نیاز به اسیدهای چرب اشباع نشده (PUFA) خاصی است، که اسیدهای چرب ضروری (FAS) نام

1 - Eicosapentaenoic acid (EPA)
2 - Docosahexaenoic acid (DHA)

گرفتند (۷۷، ۸۷). اصطلاح اسیدهای چرب ضروری[1] اشاره به یک نوع خاصی از اسیدهای چرب اشباع نشده دارد که فرد برای سلامت خود باید آن‌ها را مصرف کند، اسید لینولئیک (LA) (ω6) و آلفا لینولنیک اسید (ω3) اسیدهای چرب ضروری هستند که بدن انسان قادر به سنتز آن‌ها نمی‌باشد و باید آن‌ها را از طریق رژیم غذایی خود بدست آورد (۴۲). همچنین می‌توان به آراشیدونیک اسید (ARA)[2] (ω6) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (ω3) اشاره کرد که جزء اسیدهای چرب ضروری شناخته شده محسوب می‌شوند که در رشد بافت مغز و بویژه در رشد و توسعه شبکه عصبی و عملکرد شبکیه چشم در نوزادان دخالت دارند (۲۶،۴۲). در ۱۵۰سال اخیر، تغییراتی در میزان نسبت امگا۶ به امگا۳ در فرآورده‌های غذایی ایجاد شده است. که تا حدی ژنتیک انسان‌ها تحت تاثیر این تغییرات و در پاسخ به این رژیم غذایی بوده است. در طی تکامل، تقریبا اسیدهای چرب امگا در تمامی غذاهای مصرفی از جمله گوشت، گیاهان، تخم مرغ، ماهی، انواع آجیل و مغزها وجود داشته است. بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک و آزمایش‌های بالینی رابطه بین مصرف اسیدهای چرب ضروری امگا۳ و اثرات سودمندی در بیماری های مختلف نشان داده‌اند: از آن جمله می‌توان به اختلالات قلبی و عروقی، سرطان‌های مختلف، آسم، بیماری التهابی روده، پوکی استخوان را اشاره نمود. جنبه مهم و مورد بحث که در تمام این بیماری‌ها بیشتر مشاهده شد ارتباط بین مصرف امگا ۶ و امگا۳ بوده است. چون اسیدهای چرب امگا-۳ تقریباً منحصراً در بافت آبزیان وبالطبع در روغن ماهی یافت می‌شوند ، جهت تامین نیازهای ضروری روزمره هر فرد یا باید در هفته بین ۳ تا ۶ وعده ماهی دریایی تازه مصرف کند و یا از فرآورده های خوراکی حاوی روغن ماهی که دارای اسیدهای چرب امگا۳ بهره جست (۱). سر دسته اسیدهای چرب غیر اشباع امگا۳ ، ایکوزاپنتاانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزاانوئیک اسید (DHA) هستند. EPA برای ساخته شدن پروستا گلاندین ها،کنترل فعالیت های عروقی ،کنترل فرآیندهای التهابی و کنترل فرایندهای انعقاد خون ضروری است و DHA با شرکت در ساختار شبکیه چشم ، بافت خاکستری مغز و سیستم تولید مثل باعث عملکرد صحیح آنها می‌شود، همانطور که

1 - Essential fatty acids
2 - Arachidonic acid (ARA)

کمبود آن به اختلالات عملکرد رایج ارگان‌های یاد شده می‌انجامد. در جوامع صنعتی عصر حاضر، رژیم غذایی مردم سرشار از اسیدهای چرب امگا۶ (روغنها و چربی های گیاهی) و متاسفانه فاقد اسیدهای چرب امگا۳ ارزیابی شده است. در یک بررسی که در کشور کانادا انجام شده، هر فرد کانادایی حداکثر فقط ۲۰٪ نیاز واقعی روزانه به ترکیبات امگا۳ را از رژیم غذایی خود دریافت می‌کند یعنی در واقع امگا۳ برای هر فرد روزانه ۷۵۰-۶۵۰ میلی‌گرم برآورد گردیده است. توصیه می‌شود این ناهنجاری تغذیه‌ای با استفاده منظم از فراورده‌های خوراکی حاوی ماهی، روغن ماهی و یا آبزیان سردابی ترمیم شود . با توجه به نسبت تاثیر امگا۳ به امگا۶ ، یک نسبت مناسب و متعادل بین امگا۶ و اسیدهای چرب ضروری امگا۳ برای پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی و عروقی باید در نظر گرفت که بسیار مهم است. برای پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی، نسبت ۱:۱ امگا۳ به امگا۶ با کاهش ۷۰٪ درکل مرگ و میرها در ارتباط است (۸۰،۸۱). برای آنکه بدن ما بتواند از امگا۳ و امگا۶ موجود در مواد غذایی، مشتقات مورد نیاز خود را بسازد بایستی آن دو ماده را به نسبت متعادل با یکدیگر دریافت کند. نسبت ایده‌آل امگا۶ به امگا۳ می‌بایست ۱:۱ و حداکثر ۴:۱ ω6:ω3 باشد، اما متأسفانه این مقدار در افراد جامعه ۱۱:۱ تا ۳۰:۱ است یعنی مصرف امگا۶ در اغلب موارد سی برابر بیش از امگا۳ است. بنابراین، می‌توان گفت که PUFAها اسیدهای چرب ضروری هستند که برای حفظ سلامتی و همچنین برای رشد و عملکرد طبیعی بدن انسان ضروری هستند (۶).

۱-۶ نقش بیولوژیکی اسیدهای چرب

در طول زمان تغییراتی در رژیم غذایی رخ داده است که باعث تغییر در نوع چربی مصرفی و افزایش مصرف چربی‌های اشباع شده به خصوص مصرف چربی‌های حیوانی و کاهش مصرف چربی‌های غیراشباع (روغن‌های گیاهی و دریایی) شده است (۷،۹۹). ممکن است این تغییر در ترکیب رژیم غذایی تاثیر زیادی در ترکیب اسیدهای چرب بافت‌های انسانی داشته و متابولیسم بدن و سلامت آن را تحت تاثیر قرار دهد (۱۰). لیپیدها (روغن و اسیدهای چرب) برای رشد و بقای تمام موجودات ضروری

هستند. آنها اجزای مهم ساختار غشاء هستند و همچنین نقش حیاتی در ذخیره‌سازی انرژی و سیگنالینگ دارند. علاوه بر این، اسیدهای چرب اشباع نشده می‌توانند به عنوان پیش سازهای سوخت و ساز بدن برای عملکردهای ایکوزانوئیدها عمل کنند. گنجاندن روغن بذر کتان یا روغن ماهی در رژیم غذایی منجر به کاهش سنتز ایکوزانوئیدهای پیش‌التهابی در بیماری‌های التهابی می‌شود. اسیدهای چرب نقش‌های متعددی در زندگی و سلامت انسان و حیوانات دارند. مهمترین آن‌ها، اسیدهای چرب ضروری هستند که بخشی از لیپیدها بوده و یکی از سه جزء اصلی ماده بیولوژیکی (به همراه پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها) را تشکیل می‌دهند (۱۱). اسیدهای چرب سوبستراهای مهمی برای تامین انرژی هستند که ۳۰٪ از کل انرژی مصرفی در انسان را تامین می‌کنند. مقادیر اضافی اسیدهای چرب می‌توانند در بافت‌های چربی ذخیره شوند، به ویژه هنگامی که مصرف غذاهای حاوی چربی و کالری بالا افزایش پیدا می‌کند که باعث ایجاد چاقی می‌شود. در بافت‌های حیوانی و گیاهی، فراوانترین اسیدهای چرب که دارای تعداد اتم‌های کربن ۱۶ و ۱۸ هستند یعنی پالمیتیک‌ها، شامل استئاریک، اولئیک و لینولئیک است. اسیدهای چرب در موجودات به زنجیره‌ای با طول ۲۴-۱۲ کربن، با ۶-۱ پیوند دوگانه می‌رسند. با این حال، اسیدهای چرب با زنجیره‌ای با طول کوتاهتر از ۱۴ و بیشتر از ۲۲ کربن در حال حاضر تنها در غلظت‌های جزئی شناسایی شده‌اند. حدودا نیمی از اسیدهای چرب گیاهان و حیوانات غیر اشباع و شامل ۶-۱ پیوند دوگانه هستند. در جانوران آنزیم دسچورازی[1] که روی کربن شماره ۹ پیوند دوگانه ایجاد کند وجود دارد و دسچورازهای دیگر پیوندهای دوگانه بعدی را همیشه بین پیوند دوگانه اولی و عامل اسیدی ایجاد می‌کنند. در جانوران و انسان دسچوارزی (*Δ12* and *Δ15-desaturase*) که بتواند بین کربن ۱۰ و کربن انتهایی پیوند دوگانه ایجاد کند وجود ندارد، در حالی که چنین آنزیم‌هایی در گیاهان و میکروارگانیسم‌های مانند قارچ‌ها و مخمرها، و ریزجلبک‌ها وجود دارند. بنابراین اسیدهای چرب لینولئیک اسید که یک پیوند دوگانه روی کربن ۹ و پیوند دوگانه دیگری روی کربن ۱۲ دارد و آلفالینولنیک اسید که دارای پیوند دوگانه روی کربن‌های ۹،۱۲،۱۵

1- Desaturase

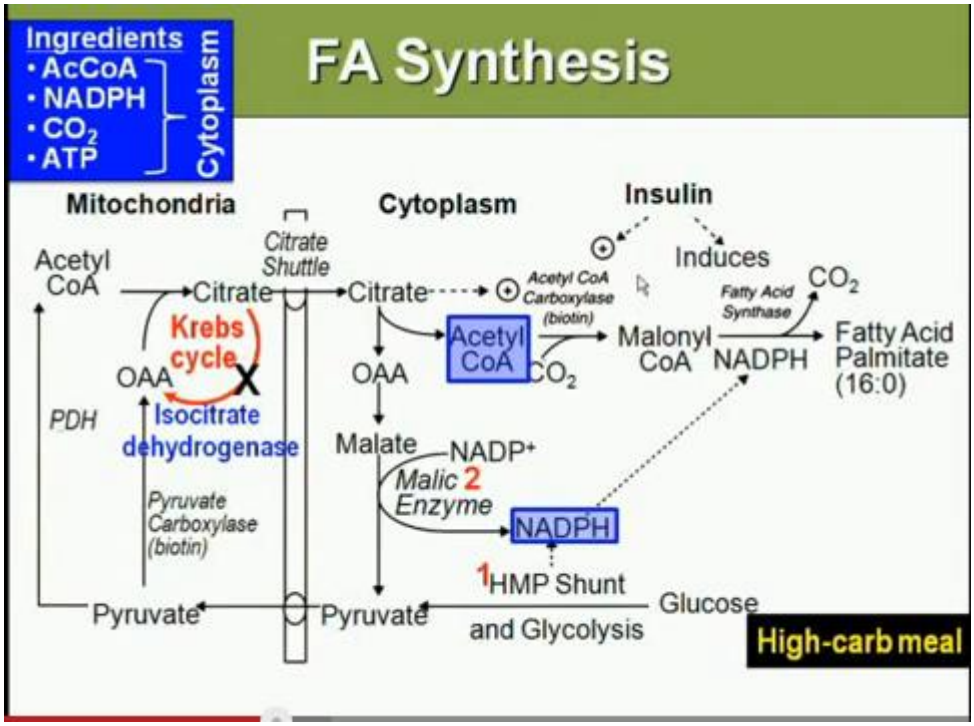
است در انسان ساخته نمی‌شوند. به همین دلیل لینولئیک (LA; 18:2 n-6) آلفالینولنیک اسید (ALA; 18:3n-3) باید از طریق غذا تامین شوند و به همین دلیل به آنها اسیدهای چرب ضروری می-گویند. طویل سازی و غیر اشباع سازی این اسیدهای چرب (ALA, LA) باعث تولید PUFAهای بلند زنجیر، از جمله ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA; 20:5n-3) اسید دوکوزاهگزانوئیک (DHA; 22:6n-3) و اسید آراشیدونیک (AA;20:4n-6)، که ممکن است در انسان بسیار موثر باشند. بنابراین، این اسیدهای چرب ممکن است با توجه به شرایط مورد نیاز در متابولیسم بدن به اسیدهای چرب ضروری تقسیم شوند. منابع غنی PUFA روغن ماهی و گوشت ماهی‌های پر چرب است (۲۵). اسیدهای چرب می‌توانند با توجه به ساختارشیمیایی، نقش فیزیولوژیکی و اثرات بیولوژیکی متفاوتی داشته باشند: از نظر شیمیایی، لیپیدها استرهای اسید چرب آلی با الکل- اسیدچرب، گلیسرول و اسفنگوزین‌ها هستند. چربی‌ها در گردش خون بشکل لیپوپروتئین، که از استرهای کلسترول، تری گلیسرول‌ها و فسفولیپیدها تشکیل شده‌اند، حضور دارند. اسیدهای چرب غیر استریفیه به آلبومین پلاسما متصل هستند. اسیدهای چرب موجود در قالب فسفولیپیدها (عمدتا فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین، *N*-اسفنگومیلین)، بخش اصلی همه غشاها را تشکیل می‌دهند و برای سیالیت و عملکرد غشاء ضروری هستند. کل چربی‌ها و همچنین، میزان مصرف انواع چربی‌ها میزان تاثیر آن‌ها بر سلامت را تعیین می‌کنند (۲۵). در مورد اسیدهای چرب اشباع، می‌توان گفت که این نوع اسیدهای چرب به سرعت جذب می‌شوند، و اسید استیک و اسیدهای پروپیونیک که جزء این گروه هستند تا حد زیادی توسط گردش خون در سیاهرگ‌ها جذب می‌شوند و به کبد منتقل و اسید پروپیونیک به گلوکز و اسید استیک به اسید چرب تبدیل می‌شوند. این فرآیند می‌تواند ۱۰ تا ۲۰٪ از مصرف انرژی بدن انسان در حال استراحت را پوشش دهد. نکته مهم، بوتریک و تا حدی اسیدهای پروپیونیک می‌باشند که در متابولیسم، تکثیر و ترمیم (تکثیر سلولی) استفاده می‌شوند. این اسیدهای چرب عمدتا در روغن نارگیل، روغن هسته خرما و کره کاکائو (درخت کاکائو) وجود دارند. از منابع حیوانی کره و چربی

گوشت گاو حاوی اسیدهای چرب اشباع هستند. امروزه از نظر علمی ثابت شده است که سطح و ترکیب کلسترول سرم دربروز آترواسکلروز و نهایتا بیمارهای پیشرفته و حملات قلبی موثر است و از سوی دیگر غلظت و ترکیب کلسترول سرم از طریق تغییر در نوع و مقدار چربی مصرفی در رژیم غذایی قابل اصلاح است. نتایج تحقیقات علمی حاکی از آن است که اسیدهای چرب اشباع با تعداد اتم کربن کمتر از ۱۲ و نیز اسید استئاریک با ۱۸ اتم کربن هیچ تاثیری در تغییرات کلسترول خون ندارند. در مقابل، اسید مریستیک با ۱۴اتم کربن بیشترین تاثیر را در افزایش لیپوپروتئین‌ها با چگالی بالا[1] (LDL) وکاهش لیپوپروتئین با چگالی پایین[2] (HDL) دارد که در نتیجه کلسترول کل هم افزایش می‌یابد و پس از آن به ترتیب اسید لوریک با ۱۲ اتم کربن و اسید پالمیتیک با ۱۶ اتم کربن اثراتی مشابه اسید مریستیک دارند. در نتیجه، مواد غذایی حاوی روغن‌های مریستیکی و لوریکی (روغن نارگیل وهسته پالم) باید بسیار مضر باشند (۴۶). اصلی‌ترین گروه‌های اسیدهای چرب غیراشباع در رژیم غذایی شامل گروه امگا۶ (LA) و امگا۳ (ALA, DHA, EPA) است به دلیل عدم توانایی بدن در سنتز آن‌ها، روزانه باید در مقادیر لازم به بدن برسند. کمبود این چربی‌ها عوارض بسیار جدی از جمله علائم پوستی، عصبی، گوارشی، عملکردی و مغزی را به دنبال دارد. اسیدهای چرب ضروری غیر اشباع (PUFA) اثرات ضد انعقادی و ضد باکتریایی دارند. تاثیر آنها بر غلظت لیپوپروتئین، سیالیت غشاء، عملکرد آنزیم‌های غشائی و رسپتورها (گیرنده‌های غشائی)، تنظیم تولید ایکوزانوئیدها، تنظیم فشار خون و متابولیسم مواد معدنی موثر هستند. اسیدهای چرب امگا۳ مانند ایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزا پنتانوئیک اسید عمدتا در انسان از منابع خارجی تامین می‌شوند. همچنین خواص منحصر به فرد این اسیدهای چرب نقش مهمی در مکانیزم انتقال سیگنال‌ها بازی می‌کند، احتمالا توسط تنظیم سیگنالینگ پروتئین G. به عنوان لیگاند برای تکثیر گیرنده‌های پراکسی‌زوم فعالیت می‌کنند، تعدادی از اسیدهای چرب غیراشباغ امگا۳ اثرات پلیوتروپی بر روی متابولیسم چربی و انرژی دارند (۵۴).

1 - Low- density lipoproteins
2 - Hig- density lipoproteins

۱-۷ مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب

در هنگام تغذیه بخشی از گلوکز و اسیدهای آمینه اضافی رژیم غذایی به اسیدهای چرب تبدیل می‌شوند. این اسیدهای چرب و اسیدهای چرب رژیم غذایی، در بافت چربی و سایر بافت‌ها به صورت گلیسیرید ذخیره می‌شوند. در هنگام ناشتا اسیدهای چرب از محل ذخیره آزاد شده و بسیاری از بافت‌ها به جای استفاده از گلوکز، آنها را مورد مصرف قرار می‌دهند. سنتز اسیدهای چرب، با استفاده از ملکول‌های استیل حاصل از تجزیه جزیی گلوکز و اسیدهای آمینه، در کبد و به مقدار کمتر در بافت‌های چربی صورت می‌گیرد. اسیدهای چرب در گردش خون به وسیله ی سلول‌ها برداشته شده و در میتوکندری با تولید NADH و FADH2 به استیل کوآ می‌شکنند. سپس این ۳ محصول در ماتریکس میتوکندری برای تولید انرژی از طریق چرخه‌ی تری‌کربوکسیلیک اسید و فسفوریلاسیون اکسیداتیو استفاده می‌شوند. استفاده از اسیدهای چرب برای تولید انرژی به طور قابل توجهی از بافتی به بافت دیگر متفاوت بوده و به طور قابل توجهی به حالت متابولیکی مثل سیری و ناشتا بستگی دارد. قبلا تصور می‌شدکه سنتز اسیدهای چرب (لیپوزنز) صرفا به صورت معکوس واکنش‌های اکسیداسیون در داخل میتوکندری‌هاست، امروزمشخص شده که یک سیستم بسیار فعال خارج میتوکندری برای سنتز کامل پالمیتات از استیل کوآنزیمA درسیتوزول صورت می‌گیرد (شکل۱-۲). سیستم دیگری برای طویل کردن زنجیره‌ی اسیدهای چرب نیز در شبکه‌ی آندوپلاسمیک کبد وجود دارد.

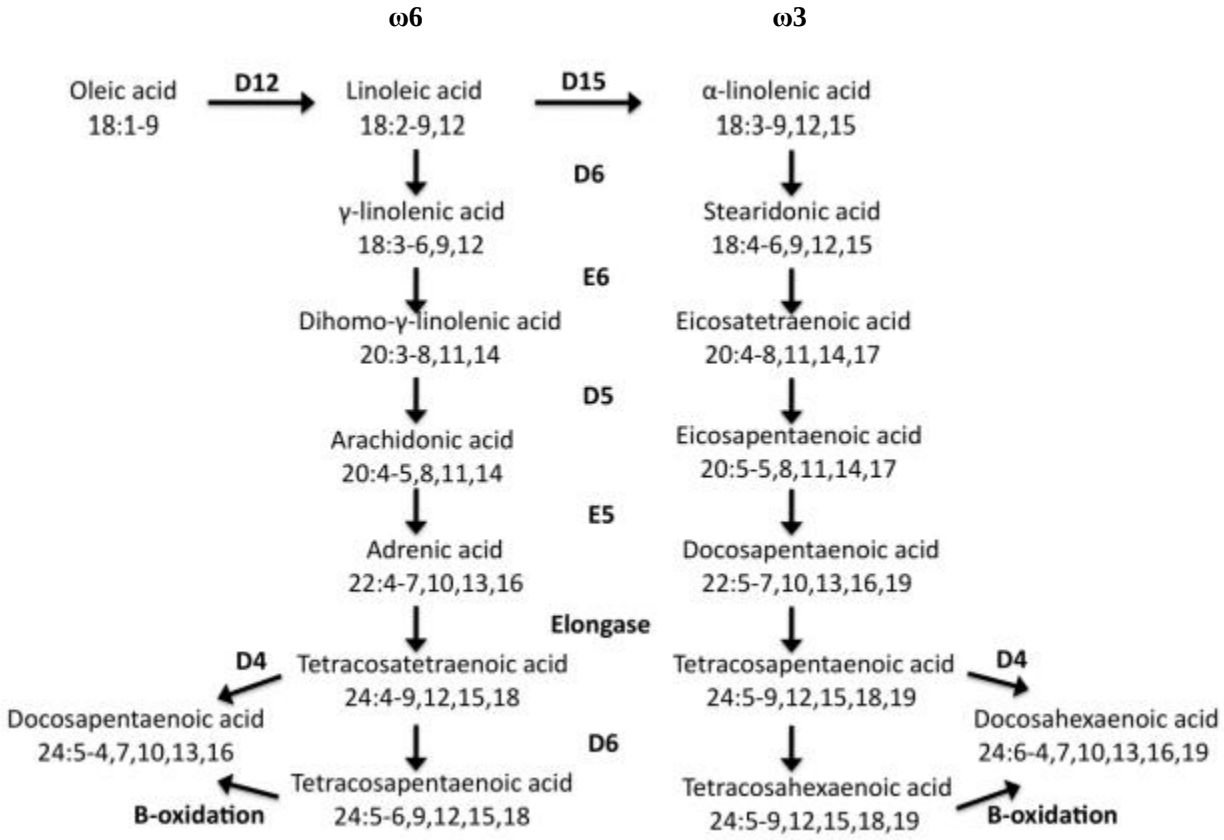


شکل۱-۲ مسیر بیوسنتزی اسیدچرب در سلول، (https://www.studyblue.com)

کمپلکس آنزیمی اسید چرب سنتاز واکنش‌های مربوط به سنتز اسیدهای چرب را کاتالیز می‌کند. با وجودی که تقریبا در تمامی موجودات واکنش‌های سنتز اسیدهای چرب یکسان هستند، اما این کمپلکس آنزیمی در گیاهان در مناطق دیگری صورت می‌گیرد. محل اصلی تولید اسید چرب در گیاهان پلاستید سلول‌های گیاهی تشخیص داده شده است. این پلاستیدها در بافت‌های فتوسنتز کلروپلاست و در بافت‌های غیر فتوسنتزی لوکوپلاست و یا آمیلوپلاست می‌باشد. در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر تولید اسیدچرب در داخل میتوکندری منتشر شده است، اما میزان فعالیت میتوکندری در این جهت نسبت به فعالیت پلاستیدها بسیار کم و ناچیز برآورد شده است.

۱-۸ مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع

اصطلاح مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیر اشباع (ω3/ω6) اشاره به مجموعه‌ای از ژن‌های دارد که اگر تحت شرایط مناسب بیان شوند، آنزیم‌های کاتالیز کننده یک یا هر دو اسید چرب امگا۳ و امگا۶ را تولید می‌کنند (۲۵). به طور معمول ژن‌های دخیل در کدگذاری مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب، برخی یا همه آنزیم‌های زیر می‌باشند: *Δ12 desaturase, Δ15 desaturase , Δ6desaturase Δ5desaturase, elongase, Δ17 desaturase, Δ9 desaturase, Δ8desaturase , Δ4 desaturase.* یک نمونه از مسیر تولیدی (شکل۱-۳) برای تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید از طریق واسطه‌های مختلف که با تبدیل اسید اولئیک به لینولنیک اسید شروع می‌شود، نشان داده شده است که چگونه هر دو اسید چرب امگا۳ و امگا۶ ممکن است از یک منبع مشترک تولید شوند (۲۵). مسیرهای بیوسنتزی که منتهی به شکل‌گیری EPA و DHA می‌شوند، در طی چند سال اخیر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پیش‌سازهای مورد نیاز برای بیوسنتز این اسیدهای چرب لینولئیک اسید و آلفالینولنیک اسید می‌باشند،که نمی‌توانند در پستانداران سنتز شوند و از این رو تامین آنها از طریق رژیم غذایی ضروری است.

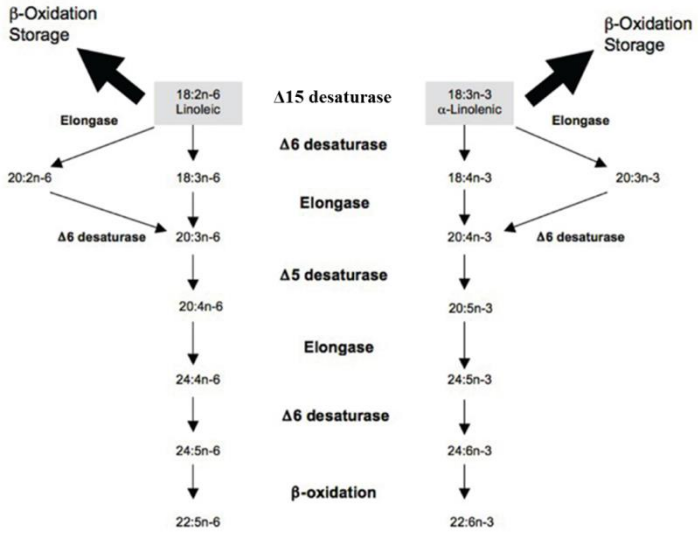


شکل ۳-۳ مسیر بیوسنتزی امگا۶ و امگا۳ برای تولید اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA)

تولید اولیه PUFAها می‌تواند در محیط زیست دریاها مانند ریز جلبک‌های فتوسنتزی، آغازیان هتروتروف و باکتری‌ها رخ دهد. سنتز مجدد PUFAها در جلبکها تا حد زیادی از طریق یک مسیر هوازی شامل اضافه شدن متوالی پیوندهای دوگانه به زنجیره اسیدهای چرب اشباع انجام می‌شود. به طور عمده اسیدهای چرب ۱۸ کربنه (۱۸:۰) و همچنین (۱۶:۰)، از طریق *دلتا۹* و *دلتا۱۲* (ω6) *دسچورازها* اسیدهای چرب امگا۶ ۱۸:۲ (لینولئیک اسید) را تولید می‌کنند، که پس از آن در مراحل

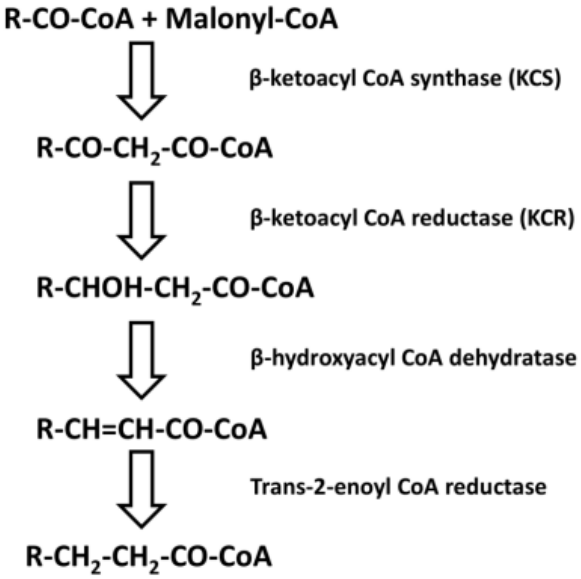
بعدی غیر اشباع سازی می‌توان به کمک دلتا۱۵یا (ω3) دسچوراز تولید 18:3n-3 (آلفالینولنیک اسید) کرد. یک توالی از دسچورازها در ابتدا و انتهای مسیر بیوسنتزی قرار دارند که پیوندهای دوگانه را ما بین پیوند دلتا۹ و پایانه کربوکسیل اضافه می‌کنند و با طویل سازی آلفالینولنیک اسید آن را تبدیل به ایکوزاپنتاانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌کنند. به طور معمول این توالی در ادامه شامل آنزیم‌های *دلتا۶دسچوراز*، *الانگاز*، *دلتا۵ دسچوراز*، *الانگاز*، *دلتا۴دسچوراز* است، اما در برخی از گونه‌ها مرحله اول طویل سازی می‌تواند تا اسیدهای چرب n-3 ۲۰:۳ کربنه افزایش پیدا کند و پس از آن توسط *دلتا۸* غیر اشباع سازی انجام شود، و آن گونه که نشان داده شده است عدم اشباع سازی n-3 ۲۰:۴ کربنه توسط *دلتا۱۷* تولید ایکوزاپنتاانوئیک اسید می‌کند. با این حال برخی از PUFAها مانند n-3 ۱۶:۴ کربنه و n-3 ۱۸:۵ کربنه در برخی از جلبک‌ها فراوان است. در سال‌های اخیر، که PUFAها یافت شده است در هر دو پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها به طور کاملا جدید از طریق مسیر بی‌هوازی شامل پلی‌کتید سنتتازها می‌توانند سنتز شوند (۱۴). گیاهان عالی بزرگترین منبع از این اسیدهای چرب‌اند، بیوسنتز این اسیدهای چرب در پلاستیدهای گیاهان انجام می‌گیرد. به طور گسترده‌ای تصور می‌شود که این اندامک‌ها از همزیستی باکتری‌های فتوسنتزی سرچشمه می‌گیرند و از این رو متابولیسم اسیدهای چرب در گیاهان شباهت زیادی با باکتری‌ها دارد (۷۴). مجموعه‌ای از واکنش‌های تکرار شونده که استیل با بخشی از آسیل‌کوآ ترکیب می‌شود، که نتیجه آن زنجیره‌هایی با طول‌های ۱۶ یا ۱۸ کربنی هست. آنزیم‌های دخیل در سنتز آن‌ها استیل‌کوآ کربوکسیلاز و اسیدچرب سنتتازها هستند. استئاریک اسید، یک اسید چرب اشباع ۱۸ کربنی است، که به اسید اولئیک تبدیل می‌شود، که یک اسید چرب تک غیر اشباعی است. *دلتا۱۲دسچوراز* اسید اولئیک را به لینولئیک اسید تبدیل می‌کند و پس از آن *دلتا ۱۵ دسچوراز* آن را به آلفالینولنیک تبدیل می‌کند. این مسیر عموما هوازی است، که بیشترین عملکرد آن در ارگانیسم‌های یوکاریوتی (سنتزPUFA) صورت می‌پذیرد.

مسیر دیگر، که شناخته شده است به طور گسترده به عنوان یک مسیر مستقل از *دلتا۴ دسچوراز* است (شکل۱-۴). این مسیر شامل دو سیکل متوالی طویل‌سازی زنجیره دو کربنه با تولید اسیدهای چرب $\Delta^{7,10,13,16,19}$ 24:5 که به دنبال آن به بوسیله *دلتا۶ دسچوراز* و یک سیکل کوتاه شدگی دو کربنه از طریق بتا اکسیداسیون در پراکسی‌زوم باعث تولید DHA می‌شود (۸۱).



شکل۱-۴مسیر بیوسنتزی اسید چرب DHA بدون حضور آنزیم دلتا۴ دسچوراز (http://www.frontiersin.org)

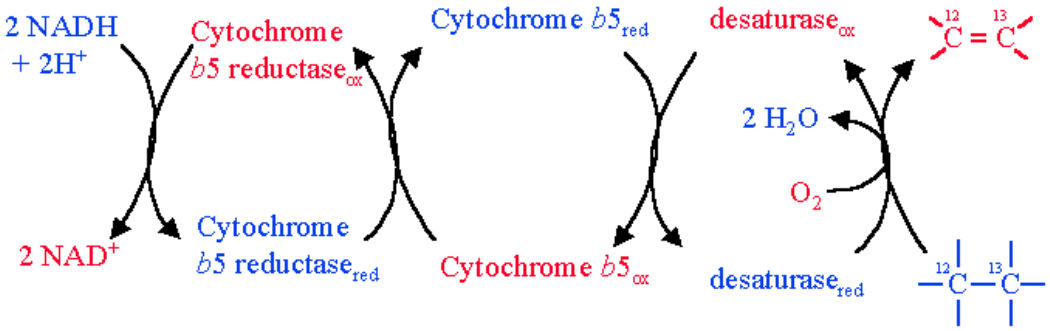
به نظر می‌رسد مسیر جایگزین برای بیوسنتز اسیدهای چرب غیر اشباع ۲۰کربنه (C20 PUFAs) در موجودات *دلتا ۶ دسچوراز* باشد،که فعالیت می‌کند. در آغازیان، *Tetrahymena pyriformis*, *Acanthamoeba sps.* و *Euglena gracilis* سنتز PUFAsها توسط این مکانیسم صورت می‌پذیرد. به تازگی، یکی دیگر از مسیرها برای DHA مسیر بیوسنتزی بی‌هوازی پلی‌کتید سنتتاز گزارش شده است (شکل۱-۵) که در برخی از باکتری‌های دریایی و یوکاریوت‌های اولیه مانند *Schizochytrium*، عضوی از آغازیان *Thr austochtriidae* رخ می‌دهد.



شکل۱-۵ مسیر بیوسنتزی پلی کتید جهت تولید اسید چرب در برخی از آغازیان و باکتری‌ها

۱-۹ آنزیم‌های دسچوراز

دسچورازها آنزیم‌های حاوی آهن هستند که یک پیوند دوگانه را به زنجیره اسیدهای چرب بلند زنجیر می افزایند. آنها یک پیوند دوگانه را در یک موقعیت ثابت به پایانه کربونیل اسیدهای چرب به صورت هوازی اضافه می‌کنند. این واکنش نیاز به مولکول اکسیژن ، NADH، یک سیستم انتقال الکترون NADPH فرودوکسن ردوکتاز و فرودکسین، یا سیتوکروم b5 ردوکتاز و سیتوکروم‌b5 و یک پایانه دسچورازی دارد. تمام دسچورازها، آسیل دسچورازهای حاوی یک دومین با پایانه N در سیتوکروم‌b5 هستند،که به عنوان دهنده الکترون به دسچورازها عمل می‌کنند (شکل۱-۶) (۷۷).



شکل۱-۶ مسیر تامین الکترون برای آنزیم‌های دسچوراز جهت آغاز فعالیت غیراشباع‌سازی اسیدهای چرب (http://www.uky.edu)

آنزیم‌های دسچوراز به دو گروه محلول و متصل بـه غشـاء تقسـیم مـی‌شـوند. دسـچورازهای متصل به غشاء به دو زیر گروه تقسیم می‌شوند: Acyl-Fatty desaturase و Acyl-COA desaturase. گروه اول در شبکه آندوپلاسمی (ER) و پلاستید گیاهی حضور دارند. دسـچورازهای آسـیل چـرب در سیانوباکتری‌ها و پلاستید گیاهان می‌توانند غیراشباع سازی استئاریک و اولئیک گروه‌های آسیل را در مونوگالاکتوزیل دی آسیل‌گلیسیرول (سیانوباکتری‌ها و پلاسـتید گیاهـان) و فسـفوتیدیل گلیسـیرول (پلاستید گیاهی) انجام دهند، در حالی که دسچورازهای شبکه آندوپلاسمی گیاهی بیشتر از اسیدهای چرب موجود درون فسفاتیدیل کولین‌ها استفاده می‌کنند. دیگر زیر گروه‌ها مربـوط بـه دسـچورازهای آسیل کوآ در درون غشاء شبکه آندوپلاسمی حضور دارند و از اسید چرب آسیل کوآ به عنوان سوبسترا استفاده می‌کنند. این‌ها در حال حاضر در جانورانی مانند حشرات و نماتدها و همچنین قارچ‌ها حضـور دارند. هویت همه دسچورازهای پستانداران به کمک آسیل کـوآ دسـچورازها قابـل شناسـایی هسـتند. گزارش‌های زیادی از همسانه‌سازی و شناسایی ژن‌های دسچوراز در دسترس است. در مقابل، کار

برروی پروتئین‌های دسچوراز به علت مشکلات عمده بر روی خالص‌سازی آنها بسیار کم بوده است. در اینجا *دلتا۱۵ دسچوراز* غیر اشباع‌سازی یک اسیدچرب را ما بین کربن‌های شماره ۱۵ و ۱۶ از پایانه کربوکسیل انجام می‌دهد و تبدیل اسید لینولئیک به آلفالینولنیک اسید را تسریع می‌کند. آلفالینولنیک اسید یک جزء از چربی‌های غشاء گیاهی است و همچنین ذخیره ساز تری آسیل گلیسرول می‌باشد. این اسید چرب با غیراشباع سازی گلیسرولیپیدهای مرتبط با لینولئیک اسید (18:2) توسط *دلتا۱۵دسچوراز* سنتز می‌شود. دو مسیر جدا برای سنتز اسیدهای چرب 18:3 کربنه در گیاهان وجود دارد، که یکی در پلاسمید و دیگری در شبکه آندوپلاسمی (ER) قرار دارد. در نتیجه، دو ایزوفرم مختلف از *دلتا۱۵دسچوراز* در اندامک‌های مختلف وجود دارد. ژن کد کننده برای ایزوفرم *دلتا ۱۵دسچوراز* موجود در شبکه آندوپلاسمی از کلزا، آرابیدوپسیس تالیانا و همچنین ایزوفرم پلاستیدی از سویا، کرچک و گلرنگ جدا شده‌اند. (۷،۱۳،۱۵،۴۸،۸۸). *دلتا۱۲* و *دلتا۱۵ دسچوراز* نقش مهمی در سنتز چربی‌های غشائی به منظور پشتیبانی از فتوسنتز دارند و این آنزیم‌ها در تمام گیاهان وجود دارند. بنابراین، گیاهان عالی غنی از AL و ALA به عنوان یک پیش‌ساز در متابولیسم PUFA می‌باشند (۷۷). برای موفقیت تبدیل اسیدهای چرب ضروری در گیاهان بومی مانند LA و ALA به اسیدهای چرب غیر اشباع PUFA مانند EPA و DHA در دانه‌ها نیاز به هماهنگی بیان ژن‌های متعدد به عنوان مثال حداقل تاثیر سه واکنش آنزیمی پی‌درپی می‌باشد (۹۰).

۱-۱۰ بیوسنتز اسیدهای چرب در مخمرها

سلول‌های مخمر کارامدتر برای تولید محصول در مقیاس بزرگ و وسیع هستند و معیارهای ایمنی و قرابت نزدیک با محصولات تازه دارند و همچنین تمامی سلول‌های مخمر بر اساس فن‌آوری بیوکاتالیتیک برای تولید انبوهی از انواع مواد شیمیایی و ترکیبات بیولوژیکی مناسب هستند (۶۰). بنابراین، سلول‌های مخمر به طور بالقوه به عنوان یک انتخاب جالب توجه برای تولید و توسعه PUFA

نیز می‌باشند. غشاء سلول‌های مخمری از سه قسمت اصلی تشکیل شده‌اند که عبارتند از: فسفولیپیدها، استرول‌ها و پروتئین‌های درون غشائی (۵۷). چربی‌ها نه تنها جزئی از اجزای غشای سلولی‌اند، بلکه در انتقال سیگنال‌ها نیز درگیر هستند. در مخمر *Pichia pastoris* نشان داده شده که میزان اسیدهای چرب اشباع نشده خیلی زیاد است. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید PUFAهای هستند که تا به امروز از آنها استخراج و شناسائی شدند. اما نقش دقیق مولکولی و بیوشیمیایی PUFAهای ذخیره شده در این میکروب‌های روغنی به طور دقیق مشخص نشده است. مقدار اطلاعات در دسترس در تحقیقات صورت گرفته در این زمینه در مقایسه با سلول‌های پستانداران بسیار کم است. ثابت شده است که مخمر *Methylotrophic Pichia pastoris* دارای یک سیستم عالی برای بیان سطح بالایی از پروتئین‌های هترولوگ به دلیل مزایای بالای که دارد، می‌باشد. تجزیه و تحلیل اولیه از ترکیبات اسید چرب در *P.pastoris* GS115 نشان داد که اسیدهای چرب آن از یک اسید چرب نسبتا ساده که به طور عمده شامل اسیدهای چرب پالمیتیک اسید (PA,C16:0) ، استئاریک اسید (SA,C18:0)، اولئیک اسید (OA,C18:1 n-9) می‌باشد و تنها از دو نوع PUFAs، اولئیک اسید (LA, C18:2 n-6) و آلفا لینولنیک اسید (ALA; C18:3 n-3) تشکیل شده است. بنابراین، برخلاف مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*،که تنها یک ژن کد کننده دسچورازی (*D9FAD*) دارد، *پیکیاپاستوریس* دارای یک سیستم نسبتا کامل بیوسنتزی PUFAs است (۴۴). مطالعات نشان می‌دهد که *P.pastoris GS115* دارای مسیر منحصر به فردی از سنتز PUFA می‌باشد: در گام نخست، احتمالا هر دو ژن *Fad9A* و *Fad9B* کد کننده *دلتا ۹ دسچوراز*[1] (*FAD9*) اسیدهای چرب اشباع (SFA) را به اسیدهای چرب تک غیر اشباعی تبدیل می‌کند، یعنی ابتدا اسید استئاریک را به اولئیک اسید تبدیل می‌کند و سپس اولئیک اسید توسط دلتا ۱۲دسچوراز[2] (*FAD2*) به لینولئیک

1 - delta9 desaturase (FAD9)
2 - delta12 desaturase (FAD2)

اسید تبدیل می‌شود، و در نهایت توسط *دلتا۱۵دسچورزا* اسید چرب سنتز و تبدیل به آلفالینولنیک اسید می‌شود. مشخص شدن مسیر متابولیک PUFA مطالعات متابولیسمی و تنظیمی بیوسنتز PUFAs را در سیستم مدلی *P.pastoris* را آسان می‌کند (۹۰).

۱-۱۱ضرورت انجام تحقیق

پروژه حاضر مربوط به ایجاد یک ساختار نوترکیب برای زمینه‌سازی تغییر مشخصات کل اسیدهای چرب در دانه گیاهان بالغ برای تولید دانه‌های روغنی که دارای میزان امگا۶ بالای نسبت به امگا۳ در روغن تولیدی درون دانه‌های خود هستند. روش‌ها و ترکیباتی که تا به امروز ارائه شده است اجازه اصلاح و دستکاری اسیدهای چرب زنجیر بلند اشباع نشده (PUFA) موجود در ترکیبات روغنی گیاهان، و حتی در مخمرهای روغنی و گیاهان روغنی (کلزا، سویا و...) را به ما می‌دهد. در این پروژه استخراج و همسانه‌سازی ژن *دلتا۱۵دسچوراز* صورت گرفت، که امکان دستکاری مسیرهای بیوشیمیایی اسیدهای چرب و افزایش تولید آلفالینولنیک اسید به عنوان سوبسترا برای تولید اسیدهای چرب غیراشباع ضروری را می‌دهد. بنابراین، این موضوع دارای کاربردهای فراوانی است. از PUFAها و مشتقات آنها توسط روش‌های که تا به امروز شناخته شدند به عنوان جایگزین در رژیم غذایی، یا مکمل‌های آنها، به خصوص در تولید شیرخشک نوزادان، یا برای جلوگیری و درمان بیماری‌های ناشی از سوءتغذیه استفاده می‌شود. علاوه بر اینکه PUFA ها در فرمول غذایی نوزادان و یا سایر محصولات غذایی گنجانده می‌شوند و به عنوان داروهای ضد التهاب ویا عوامل کاهش کلسترول استفاده شوند. حتی، در ترکیبات دارویی نیز کاربرد دارند (انسان و یا دامپزشکی). در این مورد، به طور کلی PUFAها به صورت خوراکی تجویز می‌شوند، اما توسط هر مسیر که جذب آنها را ممکن می‌سازد به عنوان مثال از طریق تزریق و یا به شکل موضعی به عنوان یک پماد یا لوسیون نیز

تجویز می‌شود. مکمل‌هایPUFAهای نوترکیب تولید شده انسانی و حیوانی می‌توانند باعث افزایش سطح PUFAها در داخل بدن جاندار شوند، همچنین به عنوان فرآیندهای متابولیکی به کار روند. در حال حاضر آلفالینولنیک اسید به عنوان یک اسید چرب اشباع نشده مهم متعلق به خانواده امگا۳ می‌باشد که توسط بدن انسان تولید نمی‌شود و از این رو باید به عنوان یک بخشی از رژیم غذایی برای حفظ سلامت انسان در نظر گرفته شود. حداقل اسید آلفالینولنیک مورد نیاز برای یک فرد ۰/۲ ٪ از انرژی مورد دریافتی توسط غذا است. از سوی دیگر FAO حداقل مصرف اسید آلفالینولنیک را ۰/۵٪ برای هر فرد توصیه کرده است. این مقادیر قابل توجه گویای این واقعیت است که ساختار بیوشیمیایی این اسید چرب مهم بوده و باعث می‌شود که نقش کلیدی در ایمنی بدن، حفاظت غشای سلولی و تولید ترکیباتی مانند هورمون‌ها داشته باشد. در حال حاضر در رژیم غذایی کمبود اسیدهای چرب غیر اشباع امگا۳ مشاهده می‌شود. در دسترس‌ترین منابع تولیدی این اسید چرب گیاهان می‌باشند، بنابراین بیان ژن در گیاهان روغنی *Δ15desaturas* به تنهایی مستعد افزایش سطوح آلفالینولنیک اسید در دانه‌های روغنی می‌باشد. علاوه بر پرداختن به تمام شرایط فوق، آلفا لینولنیک اسید به عنوان" مولکول پیش ساز اصلی برای بیوسنتز اسیدهای چرب اشباع نشده می‌باشد که بسیار برای رشد ضروری است. هدف نهایی از انجام این پروژه افزایش میزان تولید آلفا لینولنیک اسید در دانه‌های گیاهان روغنی برای تجمع روغن‌های غنی شده از اسیدهای چرب امگا۳ در میزبان است. شناسایی *دلتا۱۵ دسچوراز* و سایر امگا۳ دسچورازها برای دستکاری نسبت امگا۳ به امگا۶ در سلول-های میزبان لازم است. مناطق کدگذاری سازه حاوی ژن مورد نظر را می‌توان در گیاهان، بویژه در گیاهان دانه روغنی بیان کرد. ژن *دلتا۱۵دسچوراز* استخراج شده از مخمر *P.pastoris* که تحت کنترل توالی تنظیمی پروموترناپین در وکتور بیانی بوده و این سازه به میزبان مناسب گیاهی (توتون) انتقال یافت. بیان این ژن در گیاه می‌تواند موجب افزایش تولید آلفالینولنیک اسید شود. سازه مورد نظر

مربوط به یک ساختار نوترکیب می‌تواند برای تغییر مشخصات کل اسیدهای چرب دانه بالغ گیاهی برای تولید دانه‌های روغنی جهت تولید امگا۳ بکار برده شود. یکی از اهداف این پروژه در ارتباط با روشی برای افزایش نسبت اسیدهای چرب امگا۳ در گیاه دانه روغنی می‌باشد. همچنین جنبه دیگر، مربوط به روشی برای تولید و افزایش آلفالینولنیک اسید در بذر گیاهان روغنی است که میزان آلفالینولنیک اسید آنها حداقل (کمتر از) ۲۵٪ از مقدار کل اسید چرب در دانه‌های روغنی است. محتوای آلفا لینولنیک اسید در دانه‌های روغنی از حداقل ۲۵٪ تا ۸۹٪ و یا بین ۲۵٪ و ۸۹٪ به عنوان مثال ۲۶٪، ۲۷٪ و ... متغیر است. روغن‌های تغییر یافته در این گیاهان نوترکیب را می‌توان در ترکیبات غذایی مانند مکمل‌های غذایی، محصولات غذایی، خوراک دام و در صنایع داروئی بکار برد. (۲۵). در مقایسه با سایر روغن‌های نباتی، تصور می‌شود که روغن‌های بدست آمده از این طریق را بتوان از نظر فیزیولوژیکی در برنامه‌های غذایی به کاربرد (۲۵).

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱بازسازی مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع در مخمرها و گیاهان تراریخته

بیان ژن‌های دسچوراز برای تامین اساس مولکولی متابولیسم در موجودات، مانند سازگاری به تغییرات محیط زیستی همانند درجه حرارت، به ویژه در مورد گیاهان، سیانوباکتری‌ها، مخمرها و سایر موجودات بسیار مهم است. شبیه‌سازی ژن‌های دسچوراز از انواع موجودات بیش از ۱۰ سال است که انجام می‌شود. (۹۳) اولین مورد تغییر چربی در سیانوباکتری‌ها را توسط مهندسی ژنتیک گزارش کردند، آنها اثبات کردند که به کمک این روش امکان تغییر ترکیب چربی در موجودات وجود دارد. در ابتدا تعدادی از محققین بر روی گیاهان مدل غیر روغنی مانند آرابیدوپسیس (۵۲،۶۸) و توتون (۵۱) تمرکز کردند که کاربرد کمی برای تولید روغن به طور مستقیم در سطح زراعی داشت. در حال حاضر روش‌های انتقال کارآمدتری برای گیاهان دانه‌روغنی در دسترس مانند سویا، کلزا، ذرت (۳۲،۴۳،۶۳) ایجاد شده است و بدین ترتیب طیف وسیعی از گیاهان دانه روغنی اصلاح شده از نظر محتوای چربی رو به افزایش است. افزایش میزان تولید اسیدهای چرب غیر اشباع به کمک تکنیک دستکاری ژنتیکی در دانه‌های روغنی بوجود آمده است (۱۸) به عنوان مثال فرآورده‌های حاصل از مهندسی دانه‌های روغنی برای تولید PUFAهای خاص مانند EPA، ALA به صورت تجاری تولید می‌شوند. اولین بازسازی مسیر بیوسنتزی گامالینولنیک اسید در مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* با بیان مشترک دلتا۱۲دسچوراز و دلتا۶دسچوراز استخراج شده از قارچ *Mortierella alpina* بدست آمده است. (۴۷). بدنبال این موفقیت، تعداد دیگری از ژن‌های دسچوراز مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب غیر اشباع نیز کلون و در موجودات مختلف بیان گردیدند. تولید ARA و EPA در مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* با بیان همزمان دلتا۵ دسچوراز و دلتا۶ الانگاز به همراه تامین اسیدهای چرب مکمل صورت گرفت (۶۶،۴۷).

بعد از آن (۱۳،۲۷) هر کدام بطور جداگانه از طریق بیان همزمان سه ژن تولید مقدار کمی از ARA و EPA را در مخمر *ساکارومایسیس* را گزارش کردند، این مسیر بیوسنتزی با بیان ژن *دلتا۶دسچوراز* در حضور اسیدهای چرب پیش‌ساز AL و ALA آغاز می‌شد. (۲۸) با بازسازی مسیر بیوسنتزی ARA و تجزیه و تحلیل دقیق غیراشباع‌سازی و طویل‌سازی در واکنش ترانسفورم مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* تایید کرد که طویل سازی در حضور آسیل‌کوآ رخ می‌دهد. عملکرد ضعیف ARA به محدودیت در سوبسترای در دسترس برای طویل سازی زنجیره اسیدچرب نسبت داده شد. تولید مقدار کم GLA / SDA به ناتوانی میزبان مخمر در انتقال ذخایر آسیل کوآ به شکلی موثر نسبت داده شد. (۵۳) مسیر تولیدی اسیدچرب DHA را که با فعالیت کم آنزیم طویل سازدلتا۶ الانگاز شروع می‌شود را طراحی کردند. ژن دلتا۵ دسچوراز مربوط *Phaeodactylum tricornutum* و ژن دلتا۴ دسچوراز مربوط به آغازی *Euglena gracilis* همزمان توسط دو ژن طویل ساز دلتا۶ و دلتا ۵ الانگاز از ماهی *Oncorhynchus mykiss* و همچنین ژن دلتا۶ الانگازاز دیاتوم *T. pseduomona* و ژن دلتا۵ الانگاز مربوط به *Osteococcus tauri* جداسازی و در دو مسیر بیوسنتزی جداگانه بیان نمودند. نتایج نشان داد که هر دو مسیر در هر دو مجموعه ژنی منجر به تولید مقدار کمی DHA در حضور پیش‌سازهای اگزوژن ALA، AL شدند. در بسیاری از آزمایش‌ها برای بازسازی مسیر بیوسنتزی PUFAها در مخمر *ساکارومایسیس سرویسیه* اسیدهای چرب غیر اشباع تولید شده‌اند اما همگی نیازمند مکمل‌های بیرونی برای تولید این اسیدهای چرب در مخمر بودند. (۹۷) برای اولین بار بازسازی مسیر کلی تولید اسیدچرب GLA بدون نیاز به مکمل‌های بیرونی اسیدچرب با استفاده از ژن دلتا۱۲ دسچوراز *Kluyveromyces lactis* و ژن‌های دلتا ۶دسچوراز و دلتا ۶ الانگاز مربوط به *Rattus norvegicus* را انجام دادند. پس از بازسازی موفقیت آمیز مسیر بیوسنتزی PUFA در مخمر، محققان به طور طبیعی توجه خود را به بازسازی این مسیر بیوسنتزی در گیاهان معطوف کردند. (۷) به کمک وکتورهای دوگانه ترکیبات مختلفی از ژن‌های دلتا۶ دسچوراز مربوط به *Physcomitrella patens, Buddleja officinalis* و *Phaeodactylum tricornutum* و دلتا۶ الانگاز مربوط به *Physcomitrella patens* و

Caenorhabditis elegans و دلتا۵ دسچوراز مربوط به *Mortierella alpina* و *Phaeodactylum tricornutum* در گیاهان توتون و کتان تحت کنترل پروموتر ویژه دانه ترانسفورم و بیان کردند. با این حال، تنها مقدار بسیار کمی از PUFA در بذر گیاهان تراریخته تولید شد. تولید سطح پایین این اسیدهای چرب به دلیل ناکارآمد بودن طویل سازی پیش‌سازهای ۱۸ کربنه فرض شد، تجزیه و تحلیل منابع آسیل‌کوآ مقدار کمی از این پیش‌سازها را در مخازن تولیدی آسیل‌کوآ نشان داد. هنگامی که آسیل‌کوآ و مانوئیل‌کوآ از میکروزوم دانه‌های گیاهان تراریخته در حال رشد استخراج گردید، به یک سوبسترای موثر برای طویل‌سازی تبدیل شد. پس از حذف این داده‌ها این احتمال را دادند که سطح پایین بهره‌وری طویل سازی زنجیره اسیدهای چرب بدلیل فعالیت کم ژن تراریخت شده الانگاز می‌باشد.

۲-۲تولید اسیدهای چرب غیر اشباع نوترکیب در گیاهان تراریخته

باز سازی مسیر بیوسنتزی DHA در گیاه زراعی دانه روغنی خردل هندی *Indian mustard* (*Brassica juncea*) به کمک وکتورهای دوگانه که ۳ تا ۹ ژن را حمل می‌کردند ، که هر یک از ژن‌ها تحت کنترل مستقل پروموتر ویژه دانه بود. فرآیند مهندسی گام به گام هر یک از ژن‌ها فرصتی برای بررسی اثرات منفرد هر ژن در مسیر بیوسنتزی PUFA را ارائه داد و باعث جمع آوری اطلاعاتی مربوط به مراحل و آنزیم‌های واسط مسیر پیچیده بیوسنتزی این اسیدهای چرب شد (۹۵). گیاهان مربوط به خانواده کلزا (*Brassica juncea*) به طور طبیعی دارای مقدار کمی اسیدهای چرب لینولنیک اسید (۱۸:۳) هستند. در ابتدا با سه ژن سازه‌ای با حداقل ژن‌های لازم برای بیوسنتز PUFAهای ۲۰ کربنه برای ترانسفورم تشکیل دادند. این سازه شامل ژن‌های دلتا۶ دسچوراز مربوط به *Pythium irregulare* , دلتا۶ الانگاز مربوط به *Physcomitrella patens* و دلتا۵ دسچوراز مربوط به *Thraustochytium sp* بود. دانه‌های ترانس‌ژنیک به طور متوسط قادر به تولید ۷٪ ARA و مقادیر

کمی EPA شدند. علاوه بر این دلتا ۱۲ دسچوراز مربـوط بـه *Calendula officinalis* نشـان داد که اسیدهای چرب ۱۸:۱ کربنه (امگا۹) به ۱۸:۲ کربنه (امگا۶) تبدیل شـد، کـه در نتیجـه تولیـد ARA در دانه ۱۲٪ افزایش یافت. بر اساس نتایج مشاهده شد که طویل‌سازی خود یک عامل محـدود کننده در طی مراحل بیوسنتزی است، که باعث افزایش یک مرحله در مسـیر بیوسـنتزی غیراشـباع-سازی دلتا۶ شد. برای افزایش عملکرد اسیدهای چرب امگا۳ ژن دلتا۱۵ دسـچوراز (امگـا۳ دسـچوراز) مربوط به *Phytophthora infestans* به مسیر بیوسنتزی PUFAها افزوده شد که منجـر بـه تبـدیل موثر ARA به EPA شد. برای تولید کافی EPA، ژن دلتا۴ دسچوراز، (به نام لیزوفسـفوتیدیل کـولین آسیل‌ترانسفراز) مربوط به *Thraustochytrium sp* و ژن دلتـا۵ الانگـاز مربـوط بـه *Oncorhynchus mykiss* به صورت یک سازه در مسیر بیوسنتزی برای تولید DHA افزوده شـدند. ایـن سـازه از ژن‌هـا نشان دادند که بیشترین تعداد ژن‌های بیان شده مربوط به یک سازه در گیاهان هستند، که میـانگین بازده DHA در کل ۰/۲ ثبت شد (۹۵). ژن دلتـا۶ دسـچوراز را از *Spirulina platensis* جداسـازی و توسط وکتور بیانی تحت کنترل پروموتر CAMV35S در سویا بیان کردند، که منجر به تجمع ۳/۸ ٪ GLA در مقایسه با گیاهان شاهد شد. همچنین (۶۷) یک سازه ژنی متشـکل از ژن‌هـای دسـچوراز و الانگاز را از چندین میکروارگانیسم جداسازی تحت یک سازه ژنی و تحت کنتـرل پروموترهـای ویـژه دانه در گیاه آرابیدوپسیس جهت افزایش تولید DHA بیان کردند. در این سازه ژنی دلتا۱۵دسچوراز از مخمر *Pichia pastoris* جهت افزایش میزان تولید ALA اسـتفاده گردیـد. بـا افـزایش میـزان قابـل توجهی از ALA در گیاه منجر به افزایش تولید ۱۲٪ DHA در این گیاه گردید. بیان دلتـا۶ دسـچوراز تحت کنترل پروموتر35S در کتان منجر به تجمع بسیار بالایی از GLA وSDA در کتـان شـد. کتـان دارای آلفالینولنیک بسیار بالایی است و در نتیجه دارای پتانسیل خوبی برای تولید SDA، مـی‌باشـد، همچنین بیان دسچورازهای حامل گل‌گاوزبان تحت کنترل پرومـوتر نـاپین باعـث تجمـع ۱۰ برابـری SDA نسبت به GLA در دانه شد (۶۲). با توجه به نقش غیراشباع‌سازی دسچورازها ژن‌های

دلتا۱۵ دسچوراز قادر به استفاده از اسیدهای چرب C18-C20 به عنوان سوبسترا برای تولید ALA در میکروارگانیسم‌های مانند مخمرها، باکتری‌ها و گیاهان دانه روغنی مختلف می‌باشند (۳۰،۴۶) بر طبق گزارشات تعدادی از مخمرها، همانند *S.kluyveri*، *C.albicans* ، *Kluyveromyces lactia*، *Pichia pastoris*، قادر به تولید ALA در سطوح مختلف هستند (۲۰،۳۷،۳۸،۹۸).

پیشرفت‌های زیادی در همسانه‌سازی و دستکاری ژن‌های دسچوراز اسید چرب و الانگازها در گیاهان مختلف در طول چند سال گذشته از جمله گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، کلزا، سویا و دیگر گیاهان صورت گرفته است(۱۰،۸۹). در طی چندین سال دانه‌های روغنی تراریخته به صورت مهندسی متابولیک دارای ظرفیت تولیدی هترولوگ برای سنتز اسیدهای چرب امگا۳LC-PUFA در یک سیستم تولیدی جدید کاربرد داشته، که می‌توانند جایگزین همه یا تعدادی از برنامه‌های کاربردی شوند که از روغن ماهی استفاده می‌کنند. مهندسی متابولیک، برای متابولیسم دانه‌های روغنی را می-توان از طیف گسترده‌ای از روش‌ها بدست آورد. شایع ترین روش استفاده از آلودگی آگروباکتریوم و انتقال ژن به کمک این باکتری می‌باشد. این باکتری گرم منفی به طور گسترده و طبیعی در خاک باعث ایجاد گال طوقه می‌کند و دارای توانایی انتقال بخشی از DNA خود از طریق القا تومور توسط پلاسمید به سلول‌های گیاهی می‌باشد (۴۴). تا سال‌ها پس از طراحی و ساخت موفقیت آمیز سازه حاوی مسیر بیوسنتز ω3PUFA در گیاهان با استفاده از چندین ژن دسچوراز و الانگاز ، به تازگی دانه‌های روغنی طراحی شدند که سطح تولیدی EPA و DHA در آنها هم سطح با میزان تولید این اسیدهای چرب در روغن ماهی می‌باشد. برای اولین بار برای افزایش EPA و کاراتنوئیدها با حجم بالا، استاگزانتین در سویا یک سازه ژنی حاوی ژن‌های دلتا۶ و دلتا۱۵ دسچوراز را در سویا انتقال و بیان کردند. نتایج آنها بیانگر تجمع ۳۵٪ استئاریدونیک اسید در روغن دانه‌های سویا بود (۶۵).

دلتا۶دسچوراز، دلتا۶ الانگاز و دلتا۵ دسچوراز جداسازی شده از *Mortierella alpine* به همراه

دلتا ۱۵ دسچوراز آرابیدوپسیس و دلتا۱۷ دسچوراز *Saprolegnia diclina* تحت پروموتر ویژه دانه در سویا بیان شدند. مجتوای EPA در روغن بذر به طور قابل توجهی در سطح ALA به ۲۰٪ رسید (۳۹). مسیر ثانویه طویل ساز دلتا۹ الانگاز و غیر اشباع ساز دلتا۸ برای تولید اسیدهای چرب غیر اشباعLC-PUFA کاربرد دارد. ژن دلتا۹ الانگاز *Euglena gracilis protest* ، دلتا۸دسچوراز *Isochrysis galbana* و دلتا۵ دسچوراز *M. alpina* را تحت کنترل پروموتر 35s در آرابیدوپسیس بیان و جایگزین مسیر بیوسنتزی غیر اشباع‌ساز دلتا ۸ کردند. تجمع ۶/۶٪ ARA و ۳٪ EPA از کل اسیدهای چرب در بافت برگ نشان داد که سنتز PUFA در گیاهان امکان پذیر بوده و می‌تواند جایگزین مسیرهای بیوسنتزی موجود در گیاهان شود. این نتیجه نشان داد غیر اشباع سازی امگا۳ و امگا۶ توسط مسیر دلتا۸ برای تولید PUFA در گیاهان دارای فعالیت بالایی است و همچنین امکان از میان بردن عوامل محدود کننده سرعت طویل سازی و مسیر عمومی غیراشباع ساز دلتا۶ دسچوراز/ الانگاز وجود دارد (۶۸). این نتایج نشان داد که مهندسی متابولیک مسیر بیوسنتز اسید چرب برای تولید بسیاری از اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر در دانه‌های روغنی امکان پذیر است. برای تولید آراشیدونیک اسید در سویا نیاز به تبدیل آلفا لینولنیک اسید به آراشیدونیک اسید می‌باشد. این امر نیاز به بیان سه ژن دلتا۶ ، دلتا۵ دسچوراز و ژن دلتا۹ الانگاز دارد. همچنین لینولئیک اسید به عنوان یک سوبسترا برای ژن دلتا۱۵دسچوراز در سویا برای تولید آلفالینولینیک اسید لازم می‌باشد. بنابراین، به منظور تسهیل در تولید ARA، تغییر در محتوای آلفالینولنیک اسید توسط تنظیم بیان ژن دلتا۱۵ دسچوراز در گیاه ضروری است. در تعدادی ازکلزاهای تراریخته Brassica juncea با افزایش تعداد ژن‌های موجود در مسیر سنتزی PUFA منجر به تجمع ARA تا ۲۵٪ و EPA تا ۱۵٪ از اسیدهای چرب در دانه شده است (۹). کمبود آلفالینولنیک اسید و نامتوازن بودن نسبت اسیدهای چرب امگا۳ به امگا۶ در رژیم غذایی یک عامل برای شیوع بیماری‌های قلبی و عروقی و بیماری‌های التهابی و خود ایمنی است. بنابراین نیاز به افزایش محتوای آلفالینولنیک اسید و

کاهش نسبت اسید لینولئیک به آلفالینولنیک وجود دارد (۴۲). شش ژن امگا۳(دلتا۱۵) دسچوراز در سویا و برنج کلون نمودند (۳۸). که محل فعالیت این پروتئین‌ها در درون سلول مشخص بود. ژن در برنج تحت کنترل پروموتر ویژه آندوسپرم برای ارزیابی افزایش محتوای آلفالینولینیک اسید در دانه بیان شد. محتوای آلفالینولنیک اسید منحصرا در شبکه آندوپلاسمی دانه‌ها، در لاین‌های ترانسفورم شده از ۰/۳۶ میلی‌گرم تا ۸/۵۷ میلی‌گرم افزایش یافته و ۱۰/۰۶ میلی‌گرم ، بیشتر از لاین-های غیر ترانسفورم شده بود. صفت محتوای بالای آلفالینولنیک اسید در بیش از سه نسل ارثی و پایدار ماند. تعدادی از همولوگ‌های فعالیت بیشتری در تبدیل لینولئیک به آلفالینولنیک را در دانه-های برنج نشان دادند. پروموتر ویژه آندوسپرم در شبکه آندوپلاسمی اثر زیادی بر بیان ژن دلتا۱۵ و تولید آلفالینولنیک اسید و در کلروپلاست اثر کمتری بر بیان این ژن و تولید آلفالینولنیک اسید در دانه برنج داشت. بخش عمده‌ای از برنج غذای روزانه انسان‌ها را شامل می‌شود که بالای ۸۰٪ آلفالینولنیک اسید رژیم غذایی را می‌تواند تامین کند. برنج غنی از آلفالینولنیک انتظار می‌رود در بهبود بسیاری از رژیم‌های غذایی که کمبود آلفالینولنیک دارند را جبران کند(۳۸).

۳-۲ بررسی بیان ژن‌های دسچوراز در سطح RNA

دو ژن اسید چرب دسچورازی که کلون شدند: شامل دلتا۱۲ (FAD2) و دلتا ۱۵ دسچوراز (FAD3) بودند که از *Hansenula polymorpha* جداسازی شدند، این دو ژن مسئول تولید لینولئیک اسید و آلفا لینولنیک اسید هستند. تصور می‌شود که توالی اسید آمینه‌ای *دلتا۱۲* و *دلتا ۱۵ دسچوراز* بیشتر از ۶۰٪ با هم شباهت دارند و دارای سه موتیف جعبه هیستیدین در نواحی حفاظت شده در مقایسه با دسچورازهای همولوگ شناخته شده در مخمرهای دیگر هستند. حذف ژن FAD2 باعث عدم تولید لینولئیک اسید و آلفالینولنیک اسید می‌شود، در حالی که حذف ژن FAD3 تنها باعث عدم تولید آلفالینولنیک اسید در موجود می‌شود.

نتایج نشان داد که با بیان هترولوگ هر دو ژن دلتا۱۲ و دلتا ۱۵ دسچوراز در *ساکارومایسیس سرویسیه* زمانی که پیش سازهای لینولئیک اسید به محیط اضافه شوند، باعث تولید لینولئیک اسید و آلفالینولنیک اسید در این مخمر می‌شوند. در مجموع این مطالعات نشان داد که FAD2 و FAD3 کد کننده *دلتا۱۲ و دلتا ۱۵ دسچوراز* اسید چرب‌های هستند که تنها عمل غیر اشباع سازی اولئیک اسید و لینولنیک اسید را در *H. polymorpha* انجام می‌دهند (۱۰۰). از آنجائیکه ژن دلتا۹ دسچوراز اسید چرب مسئول تنظیم نواحی تنظیمی اسید چرب و عناصر گیرنده در پاسخ به مقدار کم اکسیژن در *ساکارومایسس سرویسیه* است، آنها بررسی کردند آیا حضور این نواحی تنظیمی در نواحی بالادست این ژن‌ها، تاثیری بر عملکرد سطوح رونویسی FAD2 و FAD3 در شرایط کمک اکسیژن یا با مکمل-های مواد مغذی اسیدهای چرب غیر اشباع دارد; که در مجموع نتایج نشان داد که هر دو ژن در شرایط کم اکسیژن فعال بوده و تنها رونویسی ژن FAD3 بدلیل وجود بیش از حد اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک و آلفالینولنیک سرکوب شد. ولی سطح رونویسی FAD2 به طور قابل توجهی تغییر نکرد. این مشاهدات نشان می‌دهد که بیان FAD2 در سطح رونویسی توسط میزان حضور اسیدهای چرب کنترل نمی‌شود. این مطالعات نشان می‌دهد که امکان تنظیم بیان FAD2 توسط مکانیسم پس از رونویسی وجود دارد، در حالی که امکان کنترل بیان FAD3 در سطح رونویسی وجود دارد (۳۸). تکنیک های انتقال ژن در مهندسی ژنتیک برای دستکاری ترکیب اسید چرب کلزا با استفاده از *Brassica napus* انجام شد. پروتئین حامل استرول آسیل دسچوراز اولین کاتالیزگر در مسیر غیر اشباع سازی در بیوسنتز روغن در دانه‌ها است، که Acyl-(acyl-carrier-protein) desaturase را به Oleoyl-(acyl-carrier-protein) hydrolase تبدیل می‌کند. ژن آنتی‌سنس stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase (Stearoyl-ACP) ویژه دانه براسیکا برای کاهش غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم Stearoyl-ACP دسچوراز برای بیوسنتز لیپیدهای ذخیره‌ای در طی رشد و نمو جنین در دانه‌های کلزا مورد استفاده قرار گرفت. سطح اسید استاریک به طور چشمگیری در دانه‌های گیاهان تراریخت

افزایش یافت و یک توزیع پیوسته از سطح اسید استاریک از ۲٪ تا ۴۰٪ در دانه گیاهان تراریخت *Brassica napus* مشاهده شد. کلزا و روغن های گیاهی دیگر عمدتا از اسیدهای چرب ۱۸ کربن اشباع نشده: اسیدهای اولئیک و لینولئیک وآلفا لینولنیک تشکیل شده‌اند. علاوه بر این اسیدها چرب ، بسیاری از روغن ها نیز حاوی مقدار کم، اما مهمی از اسیدهای چرب اشباع و استئاریک هستند. آنزیم استرول اسیل موجود در پلاستید گیاهان حامل پروتئین Stearoyl-ACP دسچوراز کاتالیز اولیه واکنش‌های غیر اشباع سازی در بیوسنتز اسیدهای چرب را بر عهده دارد و در نتیجه نقش کلیدی در تعیین نسبت کل اسیدهای چرب غیر اشباع به اسیدهای چرب اشباع در گیاهان را دارد.. فن آوری RNA سنس ثابت کرده است که یک ابزار موثر برای کاهش سطح بیان آنزیم های خاص در گیاهان می‌باشد. از آنجا که مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب در تمام بافت‌های گیاه ضروری هستند، اصلاح بیوسنتز روغن دانه ممکن است نیاز به کنترل بیان RNA آنتی سنس در بافت‌های خاصی باشد. درگیاهان، اصلاح مسیر بیوسنتزی روغن دانه ممکن است نیاز به کنترل بیان RNA آنتی سنس در بافت‌های خاصی باشد. کاهش ACP-stearoyl desaturase در دانه ها نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع را تغییر می دهد و منجر به تولید یک روغن ذخیره‌ای جدید بدون به خطر انداختن یکپارچگی لیپیدهای غشایی در برگ و دیگر بافت های گیاهی می‌شود(۳۷).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱مواد شیمیایی

مواد مورد استفاده در این پروژه شامل: dNTP، $MgCl_2$، 10× PCR Buffer، Taq DNA Polymerase، DNase free deionized water، Ribonuclease A، Loading Buffer، Tric-HCl، EDTA، Boric Acid، Yeast extract، Peptone، M-MuLV reverse transcriptase ، که از شرکت سیناکلون (تهران، ایران) تهیه گردید. β- Mercaptoethanol، CTAB، PVP، NaCl ، Chloroform، IsoAmyl Alcohol، Ethanol، Isopropanole، از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد، آگاروز از شرکت Invitrogen (کالیفرنیا) تهیه گردید و آنزیم‌های برشی HindIII، SacI، XbaI ، از شرکت Fermentase (آلمان)،T4 DNA ligase ، از شرکت Bioron (آلمان)، DNA Gel Extraction Kit ، از شرکتBioneer (داجون، کره جنوبی)، تهیه شدند. سنتز این آغازگرها توسط از شرکت Bioneer (داجون، کره جنوبی) انجام شد.

۳-۲ تجهیزات مورد استفاده

اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، ترموسایکلر TaKaRa (اتسو، ژاپن)، سانتریفیوژ Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (تهران، ایران)، مایکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژل‌داک QUANTUM ST4 (سوبیا، آلمان)، ترانس ایلومینیتورZhihat Teb Azma (تهران، ایران)، سمپلر ۱۰µl، ۱۰۰µl و ۱۰۰۰µl Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، هات پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، pH متر Hanna (مجارستان)، یخچال، فریزر ۲۰- پارس(تهران، ایران) و ترازو SARTORIUS (گوتینگن، آلمان)، هود میکروبی فرپژوه (تهران) در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت.

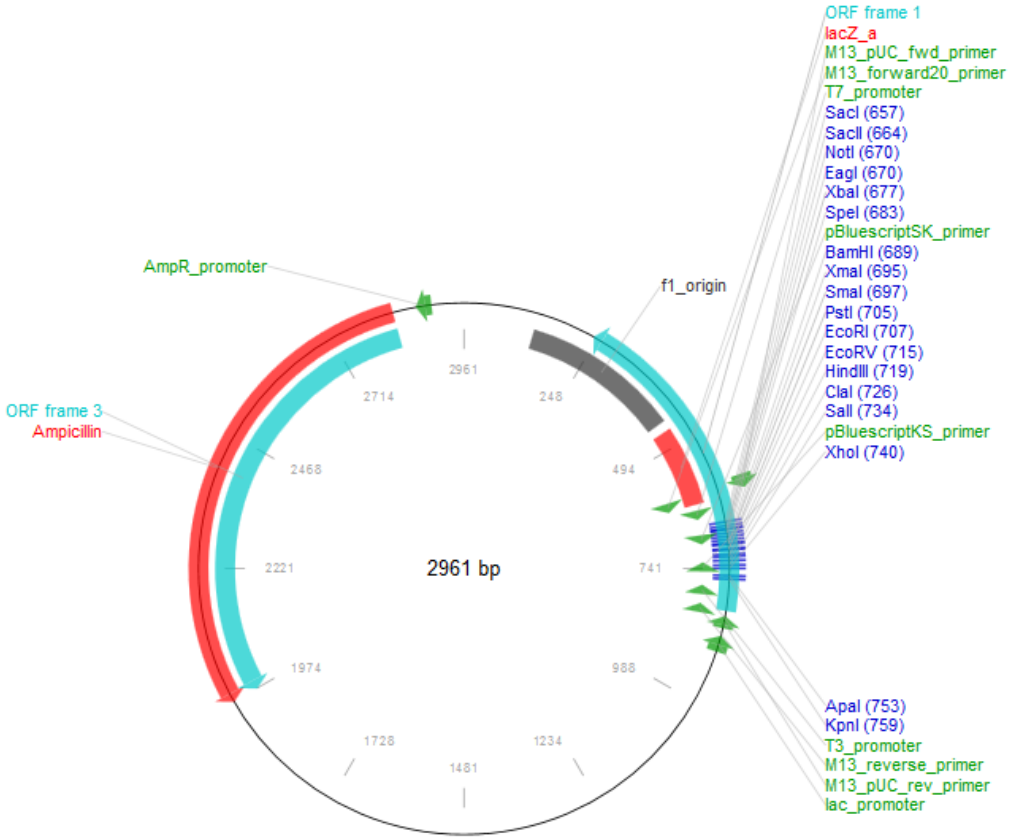
۳-۳میکروارگانیسم‌ها

برای استخراج RNA و تکثیر ژن مورد نظر از مخمر پیکیاپاستوریس(*Pichia pastoris*) سویه GS115 (انیستیتوپاستور، تهران، ایران) استفاده گردید. برای تهیه سلول‌های مستعد و سپس تکثیر پلاسمید نوترکیب از باکتری *اشریشیاکولی (E.coli)* سویه DH5α و برای انتقال سازه ژنی به گیاه از باکتری *آگروباکتریوم تومفاسینس* سویه LBA4404 پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج مورد استفاده قرار گرفت.

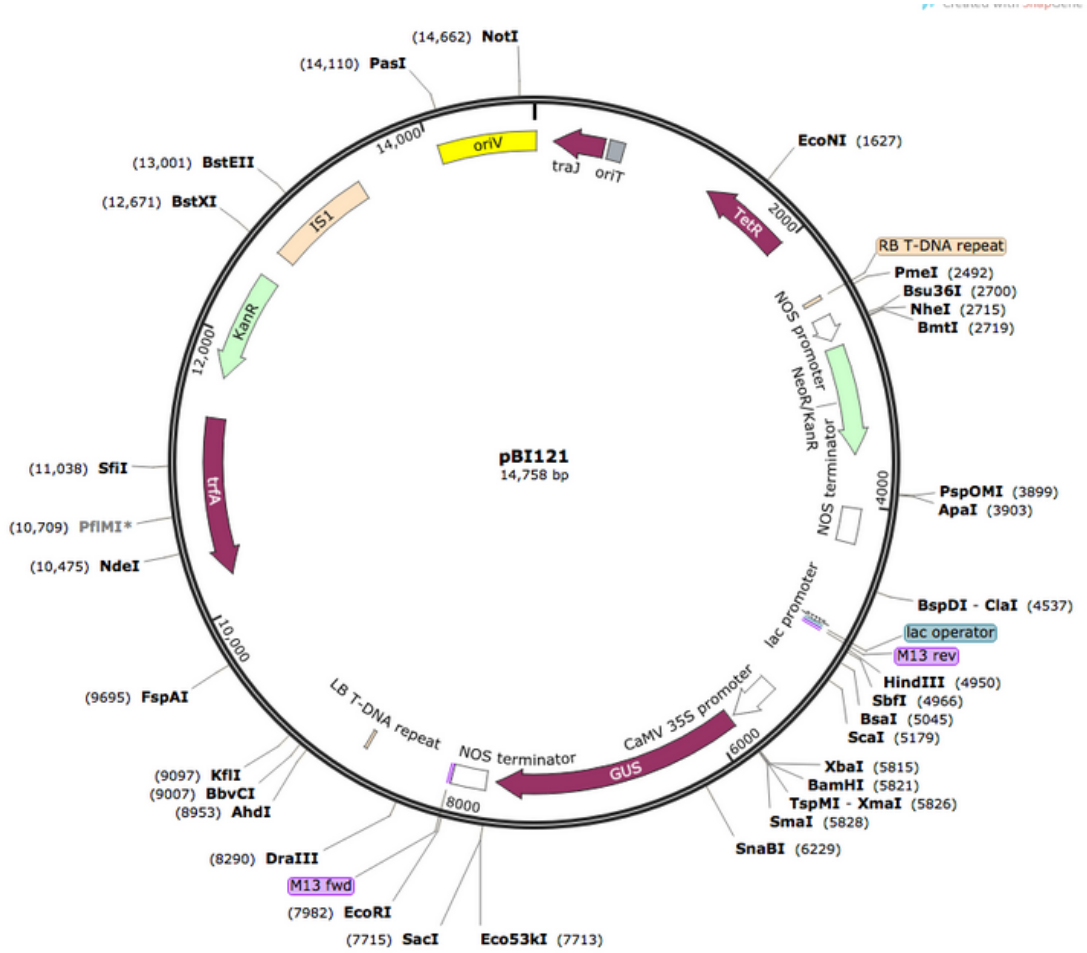
۳-۴ ناقلین مورد استفاده

از پلاسمید(+) *pBluescript II KS* نوترکیب پروموتر ژن ناپین (شکل۳-۱) تهیه شده از دانشگاه رازی کرمانشاه به عنوان ناقل همسانه‌سازی در باکتری *E.coli* سویه DH5α استفاده گردید. این ناقل به دلیل دارا بودن پروموتر ویژه دانه برای بیان اختصاصی در دانه گیاه بکار برده شد. ناقل *pks* دارای نشانگر مقاومت به آمپی‌سیلین و ژن *Lacz* می‌باشد که باعث تولید کلونی‌های سفید در باکتری‌های دارای ژن نوترکیب می‌شود.

از پلاسمید دوگانه pBI121 به عنوان ناقل بیانی و تراریزش با آگروباکتریوم در گیاه استفاده شد. ناقل pBI121 دارای نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین و تحت کنترل راه‌انداز CaMV35S و خاتمه دهنده NOS است. در شکل (۳-۲) نمای کلی پلاسمید pBI121 نشان داده شده است.



شکل ۳-۱وکتور pBluescript II KS(+) یک وکتور بیانی در باکتری می‌باشد. دارای توالی‌های T7 وT3 و همچنین دارای توالی اپران LacZ و ژن مقاومت به آمپی‌سیلین به عنوان ژن‌های نشانگر انتخابی در توالی خود می‌باشد. توالی برشی آنزیم‌های محدود کننده مورد نظر *Hind*III و *Sac*I و *Xba*I دارار می‌باشد.



شکل۳-۲ وکتور دوگانه pBI121، این ناقل دارای راه‌انداز Camv35s و خاتمه دهنده NOS است. همچنین توالی برشی سه آنزیم محدودکننده *Hind*III ، *Sac*I، *Xba*I را نیز دارد. از ناقل *pBI121* برای انتقال ژن در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۳-۵ طراحی آغازگرهای[1] اختصاصی و داخلی

توالی ژن *دلتا۱۵دسچوراز*[2] بـه شـماره دسترسـی EF116884 از پایگـاه اطلاعـاتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) بدست آمد و از روی توالی cDNA و به کمک نرم‌افزار Primer3 (http://primer3.sourceforge.net/) آغازگرهایی به طول ۳۹ جفت باز وطول محصـول ۱۲۴۶ جفـت باز و با در نظر گرفتن دمای ایجاد ساختارهای ثانویه[3]، اتصال دوآغازگر به همدیگر[4]، دمای ذوب[5]، محتوای GC[6] طراحی شد. در طراحی آغازگرهای رفت و برگشتی که جایگاه تشـخیص آنـزیم‌هـای برشـی *Sac*I و *Xba*I در انتهای ′۵ آنها در نظر گرفته شد، که قطعه‌ای به طول تقریبی ۱۲۴۶ جفت باز را تکثیـر مـی‌کنـد. همچنـین در آغازگر رفت بعد از سایت برشی و قبل از کدون ATG ابتدایی، توالی کوزاک تعبیه گردیـد. ایـن تـوالی جهـت افزایش بیان ژن در یوکاریوت‌ها می‌باشد که در توالی ژنومی اکثر یوکاریوت‌هـا وجـود دارد. همچنـین آغازگرهای داخلی IF و IR به منظور شناسایی وجود یا عدم وجود ژن در سطح DNA ژنومی در نظـر گرفته شد که قطعه‌ای به طول ۳۲۲ جفت باز و تـوالی داخلـی سـازه حـاوی ژن دلتـا ۱۵دسـچوراز و پروموتر ناپین جهت تائید اتصال ژن *دلتا۱۵دسچوراز* به پروموتر ناپین به طول محصول ۱۲۱۰جفت باز طراحی گردید. خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیـر ژن مـورد اسـتفاده در جـدول ۳-۱ آورده شده است.

1 - Primer
2 - Δ15 desaturase (Δ15de)
3 - Hairpin
4 - Primer dimer
5 - Melting temperature
6 - GC content

جدول۳-۱توالی اختصاصی و داخلی ژن *Δ15de* ، (FW وRW پرایمرهای اختصاصی)؛ (IRWD وIFWD پرایمرهای داخلی ژن *Δ15de*)؛ (IRWD وIFNP پرایمرهای داخلی ژن *Δ15de* و *napin*)

Primer	Sequense	Tm	Primer
FW	GCCTCTAGAATGTCAAAAGTCACTGTTTCGGGTTCGGG	65	39
RW	GGCTCTAGAGCCACCATGTCAAAAGTCACTGTTTCGGG	65	39
IRWD	TTG CCA CGA ATG CTA CTG GT	57	20
IFWD	GGATTCTTGGACACGAATGC	57	20
IFWNP	AAA CCG TTC GGC TCC TAT CC	57	20

۳-۶ کشت مخمر پیکیاپاستوریس

مخمر *Pichia pastoris* سویه GS115 در ۲۵ ml محیط کشت YPD[1] (حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پپتون و ۲٪ دکستروز) و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰rpm کشت گردید تا به OD_{600} رسید.

۳-۶-۱ استخراج DNA ژنومی از پیکیاپاستوریس

استخراج DNA ژنومی از سلول‌های مخمری به روش CTAB انجام شد. ترکیب اصلی در این روش یک ماده شوینده CTAB می‌باشد، که علاوه بر این خاصیت، با دارا بودن بارهای مثبت می‌تواند اطراف مولکول‌های DNA را که بار منفی دارند بپوشاند که این عمل DNA را تا حد زیادی از سایر ترکیبات جدا می‌کند، مراحل استخراج DNA به شرح زیر است:

1 - yeast peptone dextrose

در ابتدا محیط کشت حاوی سلول‌های مخمری کشت شده به فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰rpm و دمای اتاق سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی دور ریخته شد و ۱۰میلی لیتر آب مقطر استریل به منظور شست و شوی محیط کشت به فالکون‌های حاوی رسوب سلولی اضافه و ورتکس شد تا یک مخلوط همگن بدست آید. سپس به مدت ۳ دقیقه در ۴۰۰۰rpm و دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و به منظور خشک کردن و آبگیری ۳ دقیقه در ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. حدود ۵۰۰ تا ۶۰۰ میلی‌گرم از رسوب سلولی مخمر به هاون انتقال داده شد و توسط ازت مایع کوبیده شد. سپس ۸۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB[1] (حاوی ۲٪ CTAB، ۲٪ PVP 40 ، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۴ میلی‌مولار EDTA و ۲۸ مولار NaCl) اضافه شد و ورتکس گردید، تا یک مایع هموژنیزه بدست آید و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس۲/۵ میلی‌لیتر مرکاپتواتانول[2] اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی به میکروتیوب‌های جدید و استریل منتقل گردید. مخلوط کلروفرم[3]: ایزوآمیل الکل[4] به نسبت ۲۴:۱ به هر میکروتیوب افزوده شد و عمل معکوس کردن به آرامی ۴ تا ۵ مرتبه انجام گرفت. سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۲۰۰۰rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و در این مرحله سه فاز تشکیل گردید. فاز رویی که حاوی DNA با دقت به میکروتیوب جدید منتقل و مجددا کلروفرم : ایزوآمیل الکل هم حجم با مایع فاز رویی اضافه و سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰rpm انجام گردید. در این مرحله دوباره مایع رویی را جدا کرده و به میکروتیوب ۱/۵ میلی-لیتری انتقال داده شد و ۳۰۰ میکرولیتر آمونیوم استات[5] و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول[6] سرد به میکروتیوب‌ها افزوده شد تا رسوب تشکیل شود. نمونه‌ها داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت

1 - Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)
2 - β-Mercaptoethanol
3 - Chloroform
4 - Isoamyl alcohol
5 - Aminiom acetat
6 - Cold Isopropanol

یک شبانه‌روز نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰rpm رسوب سفیدرنگی ته تیوب دیده شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰٪ سرد اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سانتریفیوژ ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰rpm انجام شد. بار دوم شست و شو با الکل (v/v)۷۰٪ و سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه در۱۲۰۰۰ rpm صورت پذیرفت. به مدت یک ساعت میکروتیوب‌ها را به صورت معکوس و در باز روی دستمال استریل قرار داده تا خشک شدند. بعد از خشک شدن مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه[1] اضافه گردید تا DNA حل شود. سپس نمونه DNA استخراجی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی کیفیت و اندازه‌گیری غلظت نگهداری شد.

۳-۷ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن *Δ15de*

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای داخلی و DNA ژنومی استخراج شده از مخمر *P.pastoris* و به منظور شناسایی وجود یا عدم وجود ژن در سطح DNA ژنومی قبل از انجام استخراج RNA و ساخت cDNA انجام پذیرفت. برای انجام واکنش PCR، از دستور العمل ویلیامز[2] و همکاران (۱۹۹۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. مخلوط ۲۰ میکرولیتری PCR محتوی: ۱ میکرولیتر، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو ، ۱/۵میکرولیتر$MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase با غلظت ۲/۵ unit/µl ، آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت 10 ppm، ۲ میکرولیتر، 1× PCR Buffer دارای غلظت 10× ۲/۵ میکرولیتر، ۱/۵میکرولیتر منیزیم کلرید ($MgCl_2$) و ۱۲.۵میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل بود.

1 - Dionized Water
2- Williams

۳-۷-۱ الگوی دمای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پروتکل PCR با ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه برای آغازگرهای اختصاصی و ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای آغازگرهای داخلی ، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱:۳۰ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۲ دقیقه) ادامه یافت.

۳-۸ استخراج RNA

استخراج RNA از سلول‌های مخمر به روش فنل اسیدی گرم (۲۱) به قرار زیر انجام گرفت. ابتدا یک تک کلونی از مخمر به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایعYPD افزوده شد و به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا به مقدار رشد مورد نظر رسید. محیط کشت به فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با ۷۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و مایع رویی حذف و رسوب ته‌نشین شده نگه‌داری شد. ۱میلی‌لیتر آب مقطر استریل سرد به پلیت‌ها افزوده و مخلوط گردید و سوسپانسیون حاصله به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند، به مدت ۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۷۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند، مایع رویی حذف گردید و ۴۰۰ میکرولیتر محلول بافر TES (۱۰ میلی مولار Tris-Hcl- PH 7/5 ، ۱۰ میلی مولار EDTA، SDS 0/5%) و ۴۰۰ میکرولیتر فنول اسیدی با (pH = 5) افزوده و به مدت یک دقیقه ورتکس شدید گردید و در بن‌ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. این مرحله ۶ بار تکرار گردید. میکروتیوب‌ها از بن-ماری خارج گردیدند و به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. فاز بالایی به میکروتیوب‌های جدید ۱/۵ میلی-لیتری منتقل شدند. ۴۰۰ میکرولیتر فنول اسیدی به هر میکروتیوب افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm

در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به میکروتیوب‌های جدید منتقل و ۴۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار(pH=5.3) جهت رسوب دهی RNA افزوده شد و سپس اتانول ۱۰۰٪ به میزان دو برابر حجم هر میکروتیوب جهت شستشوی رسوب مخمر اضافه شد. سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. شستشوی پلیت RNA با اتانول ۷۰٪ و سپس سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تخلیه کامل میکروتیوب‌ها انجام و به مدت ۳۰ دقیقه به صورت بر عکس تحت شرایط استریل جهت خشک شدن کامل پلیت قرار داده شد. ۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه به پلیت افزوده شد تا پس از گذشت ۳۰ دقیقه پلیت کاملا حل گردید. میکروتیوب‌ها در دمای ۲۰- درجه تا زمان استفاده مجدد نگه‌داری گردیدند.

۳-۸-۱بررسی کمیت و کفیت DNA و RNA استخراجی

۳-۸-۱-۱ بررسی کمیت DNA به روش اسپکتوفتومتری

برای بررسی کمیت DNA، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. ابتدا با آب DEPC دستگاه کالیبره شد، سپس ۲میکرولیتر از نمونه استخراج شده به همراه ۱۹۸ میکرولیتر آب مقطر درون کوت کوارتز قرار داده شد و میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت شد.

۳-۸-۲ الکتروفورز ژل آگاروز با دستگاه الکتروفورز افقی

جهت بررسی کیفیت DNA ژنومی از نظر شکستگی از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۴۰ دقیقه برقرار گردید.

۳-۸-۳ تعیین کمیت و کیفیت RNA

به منظور تعیین خلوص و غلظت **RNA** استخراج شده از روش‌های اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز استفاده گردید.

۳-۸-۳-۱ الکتروفورز ژل آگاروز

جهت تائید استخراج RNA از سلول مخمر، نمونه RNA استخراج شده روی ژل الکتروفورز ۱/۲ درصد بارگذاری شدند.

۳-۹ تیمار باDNaseI برای حذف آلودگی DNA

جهت از بین بردن DNA ژنومی در نمونه RNA از آنزیم DNaseI استفاده گردید. ابتدا کمیت هر نمونه RNA اندازه‌گیری شد و به ازای هر یک میکروگرم RNA استخراجی یک واحد آنزیم DNaseI را به نمونه RNA اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای غیر فعال شدن آنزیم آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۳-۹-۱ سنتز cDNA

جهت سنتز cDNA، ۰/۵ میکروگرم oligodT به ۱۰میکرولیتر از RNA مرحله قبل افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲ میکرولیتر بافر ساخت cDNA10χ و ۲ میکرولیتر dNTP و ۱میکرولیترآنزیم Reverse transcriptase افزوده و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ رسانده شد. به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت غیرفعال‌سازی خاتمه رسید و cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

۳-۹-۲واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن *دلتا۱۵دسچوراز* از روی cDNA

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Δ15de* و با استفاده از cDNA ساخته شده و به منظور جداسازی ژن مورد نظر صورت گرفت مخلوط ۲۰ میکرولیتری PCR محتوی ۱میکرولیتر از DNA با غلظت۱۰۰نانوگرم الگوی تهیه شده، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم unit/µl Taq DNA polymerase ۵ ، ۱میکرولیتر آغازگر رفت و ۱میکرولیتر آغازگر برگشت ۱۰pmm ، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 1χ ۱۰ χ و با ۱۲/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل به حجم نهایی رسید.

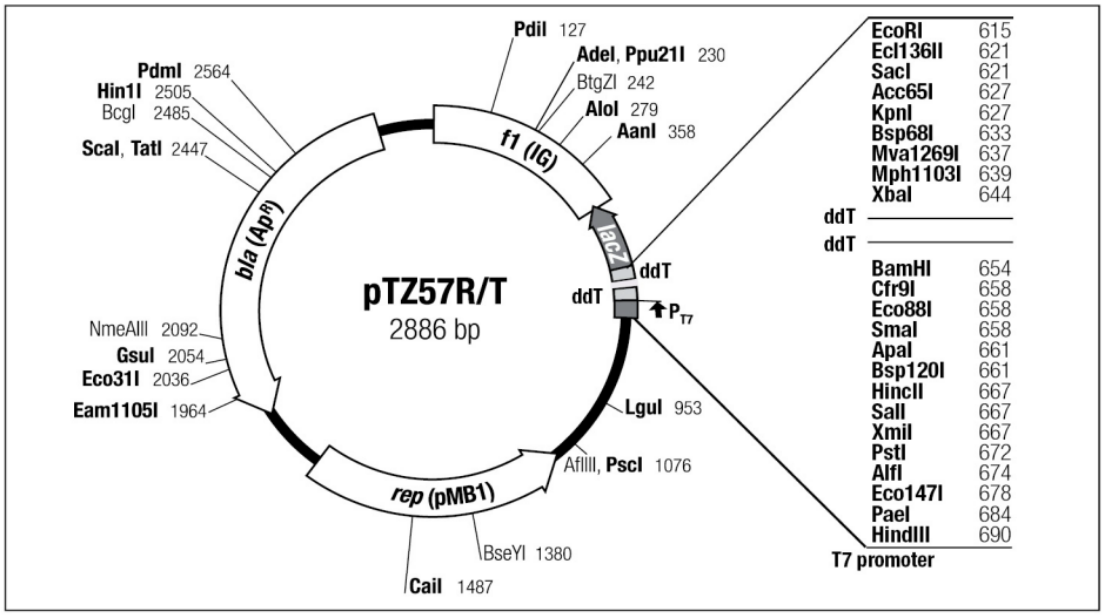
شرایط تکثیر شامل: واسرشت‌سازی اولیه۱دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه (واسرشت-سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، اتصال ۱ دقیقه در دمای ۶۵ درجه و طویل‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه) سپس طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

۳-۹-۳ انجام الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز و جداسازی قطعه تکثیری از روی ژل

محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ برده شد و به مدت ۲۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۴ ولت الکتروفورز انجام شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت. اندازه باند مورد نظر توسط نشانگر وزنی مولکولی واقع در کنار چاهک مربوط به محصول PCR تایید شد. پس از مشاهده‌ی باند مورد نظر و تایید اندازه‌ی ژل آگارز بر روی ترانس لومیناتور قرار گرفت و قطعه مورد نظر توسط تیغ اسکالپل جدا شد و استخراج از ژل ژن مورد نظر بر طبق پروتکل کیت شرکت تکاپوزیست - تهران (آلمانBioneer) انجام گرفت.

۳-۱۰ الحاق ژن *Δ15de* به درون ناقل *PTZ57R/T*

برای کلون کردن محصولات PCR نیاز به اتصال یک نوکلئوتید A به انتهای ′۳ قطعه تکثیر شده می‌باشد. آنزیم Taq DNA polymerase توانایی انجام این اتصال بدون الگو را دارد. برای کلون کردن ژن از Vector *pTZ57R/T* (شکل۳-۳) استفاده گردید. این ناقل به صورتی است که نوکلئوتید-های A در دو انتهای ژن به صورت مکمل در مقابل نوکلئوتیدهای T از ناقل قرار می‌گیرد و آنزیم لیگاز باعث اتصال آنها می‌شود.



شکل۳-۳ نقشه پلاسمید pTZ57R/T . این پلاسمید دارای جایگاه برشی آنزیم‌های محدود کننده *Sac*I و *Xba*Iاست. اتصال در این وکتور با جفت شدن نوکلئوتید A از محصول PCR و نوکلئوتید T از پلاسمید صورت می‌گیرد و پیوند فسفودی استر توسط آنزیم لیگاز برقرار می‌گردد.

برای واکنش اتصال ۱ میکرولیتر از ناقل، ۱۲ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر T4 لیگاز ۱۰ χ ، ۱میکرولیتر T4 لیگاز و در نهایت آب دوبار تقطیر به واکنش افزوده شد وحجم نهایی به ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد. به مدت یک ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول اتصال بدست آمده طبق روش بعد به باکتری *E.coli* سویه‌ی DH5α منتقل شد.

۳-۱۰-۱ تهیه سلول‌های مستعد در شرایط استریل

یک تک کلون از کشت جامد باکتری *E.coli* سویه DH5α بر داشته و در محیط LB مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دستگاه شیکر- انکوباتور با سرعت ۱۵۰rpm رشد داده شد. کشت شبانه به میزان ۱:۴۹ رقیق شده و به مدت ۲ ساعت در همان شرایط نگهداری گردید. پس از گذشت زمان مورد نیاز نمونه به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ سرد شدند. محلول حاصل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری سرد منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی بیرون ریخته شد و به باکتری‌های رسوب داده شده مقدار ۱میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۱۰۰میلی مولار سرد به رسوب اضافه گردید و به آرامی با عمل پیپتینگ مخلوط هموژن شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت بر روی یخ قرار گرفتند. طبق مرحله قبل نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله سلول‌ها آماده دریافت DNA خارجی بودند. این نوع سلول‌ها، سلول‌های مستعد نامیده می‌شوند، زیرا آماده دریافت DNA خارجی هستند.

۳-۱۰-۲ تراریختی سلول‌های مستعد باکتری *E.coli*

به منظور تراریختی باکتری *E.coli* از روش شوک حرارتی استفاده شد. به این صورت که ۱۰میکرولیتر محصول اتصال را به سلول‌های مستعد اضافه و پس از زدن چند ضربه آرام انگشت به تیوب، به مدت ۴۰ دقیقه مجددا بر روی یخ قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه درون حمام آب گرم دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و به سرعت به یخ صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه منتقل شدند. ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB بدون آنتی‌بیوتیک به میکروتیوب‌ها افزوده و به

مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بروی دستگاه شیکر- انکوباتور با سرعت ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. سلول‌های باکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm رسوب داده شدند. پس از حذف ۶۰۰ میکرولیتر از مایع رویی، رسوب به کمک ورتکس در باقیمانده محیط کشت حل شد. سپس در ۲ پتری حاوی LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت گردید. و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۳-۱۰-۳ استخراج پلاسمید

استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی به شرح زیر صورت گرفت: یک کلونی از باکتری *E.coli* حاوی پلاسمید نوترکیب مورد نظر در ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. این محیط به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد در دستگاه شیکر- انکوباتور با سرعت ۱۵۰ rpm قرار داده شد. میکروتیوب‌های حاوی محیط کشت و باکتری رشد کرده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حذف و رسوب باکتری برای مراحل بعد نگهداری شد. در این مرحله سعی شد تا حد امکان رسوب حاصل خشک شود. ۲۰۰میکرولیتر از محلول شماره I (۵۰میلی‌مولار گلوکز، ۲۵ میلی‌مولار تریس (pH = 8) و ۱۰ میلی‌مولار EDTA، محلول حاصل باید اتوکلاو شود.) به هر یک از میکروتیوب‌ها اضافه شد. و پس از ورتکس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس میکروتیوب‌ها بر روی یخ قرار داده شدند و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شماره II (۰/۲ مولار NaoH و ۱ درصد SDS) که در هر بار استخراج پلاسمید باید تازه تهیه شود، به هر تیوب اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه بر روی یخ نگهداری شد. در این مرحله عمل ورتکس کردن نباید صورت گیرد و مخلوط با چندین بار سر و ته کردن میکروتیوب‌ها انجام می‌گیرد. بلافاصله مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از محلولIII (۵۰ میلی‌مولار پتاسیم استات، ۱۱۵ میلی‌لیتر استیک اسید،) به صورت سرد اضافه گردید. در این مرحله پس از اضافه کردن محلول III باید توده سفید رنگی (ابر مانند) تشکیل شود. سپس

میکروتیوب‌ها بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع روئی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و هم حجم مایع انتقالی ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به آرامی چند بار سر و ته شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه قرار گرفت. پس از این مرحله رسوب دهی با دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت rpm ۱۲۰۰۰، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. رسوب حاصل یک بار با اتانول خالص و بار دوم با اتانول ٪۷۰V/V شستشو داده شد. بعد از تخلیه اتانول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی کاغذ صافی قرار گرفت تا رسوب حاصل خشک شود. رسوب حاصله در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید و برای استفاده‌های بعدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳-۱۰-۴ هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *Xba*I و *Sac*I

جهت تائید اتصال قطعه ژن به وکتور و همچنین جداسازی ژن از وکتور و انتقال به وکتور *pKS* هضم آنزیمی صورت گرفت. برای انجام واکنش هضم آنزیمی بر طبق پروتکل ۹ میکرو لیتر از DNA (پلاسمید نوترکیب استخراج شده) ، ۲ میکرولیتر بافر χ Tango1 ، ۰/۸ میکرولیتر ازآنزیم *Xba*I و۱ میکرولیتر از آنزیم *Sac*I و در نهایت توسط آب دیونیز به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و میکروتیوب‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند. غیرفعال سازی در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت.

۳-۱۱ الحاق ژن به درون ناقل *pBluescript II ks(+)* حاوی پروموتر *Napin*

ناقل *Pks* دارای ناحیه *Lacz* می‌باشد. همچنین دارای یک نشانگر انتخابی آمپی‌سیلین است که مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین را القاء می‌کند. این ناقل دارای جایگاه‌های شناسایی برشی آنزیم *Hind*III و *Sac*I و *Xba*I است. علاوه بر موارد بالا ویژگی دیگر وکتور بکار برده شده در این پژوهش الحاق پروموتر ناپین در این ناقل می‌باشد (۸۰). پروموتر ناپین بدلیل اینکه پروموتر ویژه دانه

می‌باشد باعث بیان ژن در بذر شده و کمک به بررسی بیان ژن در بذر گیاهان ترانسفورم شده می‌کند. در نواحی ′۵ این ژن توالی آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Xba*I تعبیه شده است. دلایلی که باعث انتخاب سایت‌های برشی *Sac*I و *Xba*I در توالی ژن *Δ15de* گردید عبارتند از : توالی این دو آنزیم در توالی ژن *Δ15de* وجود نداشت، اگر توالی در ژن موجود باشد هنگام استفاده از آنزیم برشی باعث تکه تکه شدن ژن می‌گردد. بدلیل وجود توالی *Xba*I در انتهای ژن ناپین و در نظر داشتن اینکه ژن *Δ15de* در ادامه توالی این پروموتر قرار گیرد، از توالی این آنزیم‌های برشی استفاده گردید. دلیل استفاده از این ناقل وجود پروموتر ناپین بود تا بتوان بعد از الحاق ژن *Δ15de* به این پروموتر همزمان این سازه را به ناقل دوگانه *pBI121* جهت انتقال و بررسی بیان ژن در گیاه بکار برده شود. پلاسمید *Psk* حاوی پروموتر ناپین از باکتری *E.coli* سویه DH5α استخراج شد.

۳-۱۱-۱ اتصال سازه به ناقل *PKS* حاوی ژن *Napin*

به میزان ۱۰-۵ میکرولیتر از ناقل *pKS* و قطعه مربوط به ژن *Δ15de* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و سپس واکنش اتصال صورت گرفت; مقادیر مناسبی از ژن و پلاسمید به ترتیب به نسبت ۳:۱ ۲۰ میکرولیتربافر χ 10 لیگاز T4 ، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 لیگاز، و در نهایت با آب دیونیزه به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تراریخت کردن باکتری با محصول واکنش اتصال به روش شوک حرارتی که در صفحات قبل ذکر شد انجام گرفت و باکتری‌ها بر روی محیط کشت آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین‌دار رشد داده شدند. *pKS* حاوی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین است. به منظور اطمینان از حضور ناقل تراریخت، به صورت تصادفی از کلونی‌های مختلف رشد کرده بر روی محیط آنتی‌بیوتیک‌دار به صورت تک کلون انتخاب و همزمان هم کشت مایع و هم کشت جامد انجام شد. در مرحله بعد از کلونی‌های مختلف که به صورت مایع کشت داده شده بودند پلاسمید استخراج شد. کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *Δ15de* و آغازگرهای داخلی پروموتر ناپین و *Δ15de* انجام گرفت. برای اطمینان بیشتر

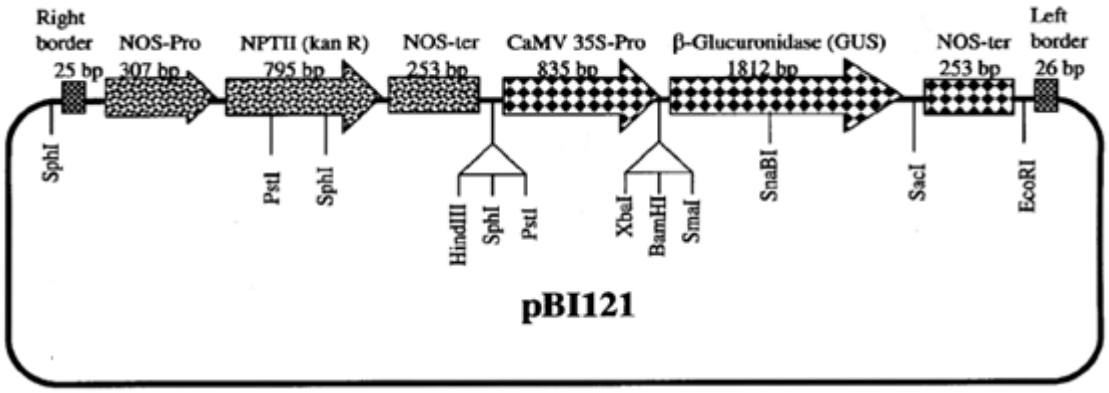
کلونی‌هایی که نتایج PCR آنها نشان دهنده قطعه مورد نظر بود. تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I قرار گرفت و قطعات حاصل و اندازه آن‌ها بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرارگرفت. یکی از راه‌های مطمئن برای اطمینان از صحیح بودن سازه *Δ15d* ، درست قرار گرفتن قطعه‌ی *Δ15d* در جایگاه مناسب و صحیح بودن نوکلئوتیدها در قطعه‌ی *Δ15d* می‌باشدکه بدین منظور، ناقل حامل ژن *Δ15d* برای توالی یابی ارسال گردید.

۳-۱۲ آماده سازی ناقل گیاهی

ناقل گیاهی مورد استفاده در این پژوهش پلاسمید *pBI121* بود (شکل۳-۲). این ناقل به روش سمبروک و همکاران(۱۹۹۸) از باکتری *E.coli* سویه DH5α استخراج شد و سپس برش با آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I به منظور حذف ژن *Gus* صورت گرفت. مراحل اتصال ژن و ناقل بر طبق پروتکل ذکر شده در بخش ۳-۱۱-۱ صورت گرفت.

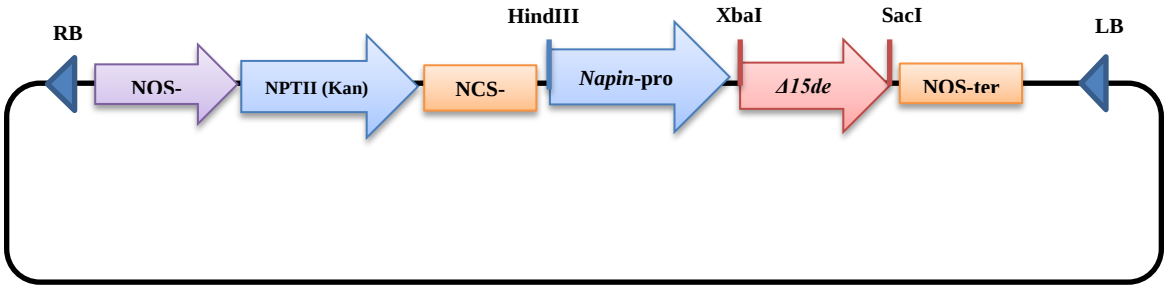
۳-۱۳ – انتقال کاست ژنی ***Nap+Δ15de*** برش خورده به ناقل ***pBI121***

ناقل *pBI121* با توالی به طول ۱۴۷۵۸ جفت باز به منظور استفاده در انتقال ژن ساخته شده است. این ناقل از ناحیه‌ی T-DNA که ۶۱۹۳ جفت باز طول دارد، تشکیل شده است. همچنین دارای دو نشانگر انتخابی است (شکل۳-۴). که عبارتند از: نئومایسین فسفوترانسفرازII (NPTII) است، که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین را القا می‌کند و دارای راه‌انداز و خاتمه دهنده (NOS) Nopalin synthase است; β- گالاکتورونیداز (*GUS*) که دارای راه‌انداز CaMV35s و خاتمه دهنده NOS است. ناحیه‌ی غیر T-DNA ۸۵۶۵ جفت باز طول دارد. این ناقل دارای جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Sac*I است. ژنی که در بین بازوی چپ و راست T-DNA قرار گیرد انتقال می‌یابد و می‌تواند هم در *E.coli* و هم در آگروباکتریوم تکثیر شود. به همین دلیل به این نوع از وکتورها، وکتور دوگانه گویند (۱۷).



شکل ۳-۴ نمایی از ناقل *pBI121* که دارای سایت‌های برشی مختلف و ژن‌های نشانگر انتخابی است. جهت وارد کردن قطعه جدید به این ناقل ، ژن GUS و پروموتر CaMV توسط آنزیم برشی *Hind*III و *Sac*I از ناقل جدا شد.

همانطور که در شکل(۳-۵) نشان داده شده است; به منظور حذف ژن *GUS* و پروموتر *CaMV35s* ایجاد انتهای چسبنده سازگار از ناقل *pBI121* از آنزیم‌های برشی *HindIII* و *SacI* استفاده شد.



شکل ۳-۵ نمایی از سازه نوترکیب *pBI121:nap + Δ15de*. پس از برش توسط آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Sac*I الحاق سازه ژنی *nap+ Δ15de* به وکتور *pBI121* صورت گرفت.

۳-۱۳-۱ انتقال سازه نوترکیب به باکتری *E.coli*

محصول لایگشن توسط روش شوک حرارتی به باکتری *E.coli* سویه DH5α منتقل و در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. به منظور اطمینان از حضور ناقل تراریخت، به صورت تصادفی از کلونی‌های مختلف رشد کرده بر روی محیط آنتی‌بیوتیک‌دار به صورت تک کلون انتخاب و همزمان هم کشت مایع و هم کشت جامد انجام شد. در مرحله بعد از کلونی‌های مختلف که به صورت مایع کشت داده شده بودند پلاسمید استخراج شد. کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *Δ15de* و آغازگرهای داخلی پروموتر ناپین و *Δ15de* انجام گرفت. برای اطمینان بیشتر کلونی‌هایی که نتایج PCR آنها نشان دهنده قطعه مورد نظر بود. تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Hind*III و *Sac*I قرار گرفت و قطعات حاصل و اندازه آن‌ها بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۱۳-۲ انتقال سازه نوترکیب به آگروباکتریوم

برای تراریختی گیاه هدف از روش انتقال ژن با استاده از آگروباکتریوم استفاده شد. لذا سازه ژنی *pBI121: Δ15de and napin* به *آگروباکتریوم* وارد گردید. برای تراریختی *آگروباکتریوم* بر طبق پروتکل انجماد و ذوب و با استفاده از $CaCl_2$ (mM) ۲۰ و ازت مایع استفاده شد. آماده سازی سلول باکتری و تراریختی به شرح زیر انجام گرفت.

یک تک کلون از آگروباکتریوم سویه LBA۴۴۰۴ در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی آنتی-بیوتیک ریفامپسین (ناقل *pBI121* مقاومت به کانامایسین را القاء می‌کند و *آگروباکتریوم* ژن مقاومت به ریفامپسین را دارد) کشت شد و در مدت دو روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفت. ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی به ۵۰ میلی لیتر محیط جدید در ارلن استریل اضافه شد و روی شیکر انکوباتور با ۱۵۰rpm در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار داده شد. سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی موجود در

میکروتیوپ در ۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریوفیوژ گردید. مایع رویی حذف شد و رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر محلول $CaCl_2$ (mM) ۲۰ سرد شده حل گردید. سوسپانسیون سلولی در ویال‌های ۱/۵ توزیع شد. ۴-۳ میکرولیتر ناقل حاوی سازه ژنی مورد نظر به هر ویال افزوده شد. به آرامی مخلوط و سپس در نیتروژن مایع به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. ویال‌ها با قرار دادن در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه ذوب شدند. ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB فاقد آنتی‌بیوتیک افزوده شد و در شیکر به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۲۸ درجه در ۱۵۰دور در دقیقه قرار گرفت. سپس در سانتریفیوژ با ۵۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه قرار گرفت و رویه بالایی حذف گردید. سوسپانسیون سلولی مورد نظر بر روی محیط کشت LB جامد حاوی مقادیر مناسبی از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین کشت داده شدند. به منظور ظهور کلونی‌های نوترکیب باکتری، پتری‌ها به طور وارونه به مدت یک الی سه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حضور سازه ژنی مورد نظر در باکتری‌ها با استفاده از کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Δ15de* و آغازگرهای داخلی ژن‌های *Δ15de* و ناپین و انجام برش توسط آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Sac*I مورد بررسی قرار گرفت. برای نگهداری باکتری‌ها در دمای ۲۰-، ۸۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه مایع باکتری مورد نظر در شرایط کاملا استریل با ۲۰۰ میکرولیتر گلیسرول به طور کامل مخلوط گردید. مخلوط حاصل قابلیت نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت طولانی را دارد.

۳-۱۴ تهیه محیط کشت گیاهی MS

محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوک، ۱۹۶۲) محیط کشتی است که در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. تهیه محیط کشت MS با استفاده از محلول‌های مادری مواد شیمیایی انجام می‌پذیرد. این محلول‌ها به طور معمول به صورت غلیظ (χ 10) تهیه می‌شود و در زمان استفاده به

میزان مورد نظر رقیق می‌گردد. محیط کشت MS شامل سه دسته مواد اصلی موسوم به مواد غذایی پر مصرف[1]، مواد غذایی کم مصرف[2] و ویتامین‌ها است. هر یک از سه دسته مواد بالا را به صورت محلول مادری و با غلظت خاص تهیه شد. به منظور تهیه محلول مادری، مواد شیمیایی باید در آب مقطر بسیار خالص و یون‌زدایی شده حل گردند. در حل مواد شیمیایی باید دقت شود تا رسوب تشکیل نگردد. در مورد محلول‌های مادری نمک‌های ماکرو و میکرو، پس از حل شدن کامل هر ماده شیمیایی ماده دوم اضافه گردید. محیط MS مورد استفاده در این پژوهش به صورت MS پایه بود که محلول‌های ذخیره مورد نیاز برای تهیه آن با توجه به جدول ۳-۲ تهیه شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

۳-۱۴-۱ ضد عفونی و کشت توتون

به منظور تهیه ریز نمونه، بذرهای گیاه توتون از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی ارومیه تهیه شد. بذور ابتدا بوسیله مایع ظرفشویی شسته شد و سپس به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ غوطه‌ور شد. سپس با آب مقطر استریل ۲-۱ مرتبه شستشو داده شد. ضد عفونی سطحی بذور به مدت ۱۵ دقیقه با وایتکس۲/۵٪ صورت گرفت. در نهایت شستشوی مجدد ۴-۳ مرتبه با آب مقطر استریل انجام شد.

[1]- Macronutrients
[2]- Micronutrients

جدول۳-۲ تهیه محلول‌های پایه موراشیگ و اسکوک(MS)

Constituent	Concentration in MS medium (mg/l)	Concentration in the stock solution (mg/l)	Volume to be taken/Liter of medium(ml)
Macronutrient (10x)			
NH_4NO_3	1650	16500	100
KNO_3	1900	19000	
MgSO4.7H2O	370	3700	
$CaCl_2.2H_2O$	440	4400	
KH_2PO_4	170	1700	
Micronutrient (100X)			
H_3BO_3	6.2	620	
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	2230	10
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	860	
KI	0.83	83	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25	
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5	
$CoCL_2.6H_2O$	0.025	2.5	
Fe.EDTA-Na salt	40	Aded fresh	
vitamins			
Nicotinic acid	0.5	50mg/100ml	1
Thiamine HCl	0.1	50mg/100ml	0.2
Pyridoxine HCl	0.5	50mg/100ml	1
Myo-inositol	100	Aded fresh	
Sucrose	30000	Aded fresh	
Agar	8000	Aded fresh	
pH	5.8		

محیط کشت MS پایه، در فشار ۱/۲ بار در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و پس از اینکه دمای محیط کشت به حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید درون شیشه توزیع شدند. سپس بذور استریل پس از خشک کردن با کاغذ صافی در شرایط استریل درون این شیشه‌ها کشت شدند و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. تکثیر مواد گیاهی از طریق تقسیم ساقه گیاهان توتون رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای به قطعات کوچکتر، که هر قطعه حداقل حاوی یک جوانه و یک برگ بود انجام شد. سپس انتقال آن به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت MS جامد حاوی mgl^{-1} ۱ هورمون BAP و mgl^{-1} ۰.۱ هورمون NAA کشت داده شد تا گیاهان باززا شوند. بعد از دو هفته از این گیاهان جهت تلقیح استفاده گردید.

۳-۱۴-۲ تهیه ریزنمونه[1]

به منظور بدست آوردن ریزنمونه، از برگ‌های تازه و جوان گیاه توتون به اندازه تقریبا ۴ سانتی‌متر استفاده شد. جهت تلقیح با باکتری برگ‌ها به شکل چهارگوش بریده شدند و در وسط برگ نیز زخم‌هایی با نوک اسکالپل ایجاد شد.

۳-۱۴-۳ تراریزش توتون با استفاده از *آگروباکتریوم*

انتقال ژن به گیاه توتون به روش آگروباکتریوم و باززایی مستقیم ریزنمونه‌های گیاهی توسط کشت بافت در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سفوتاکسیم صورت گرفت. از آنتی‌بیوتیک های کانامایسین (برای گزینش گیاه تراریخت احتمالی) و نیز سفوتاکسیم (به دلیل محدودیت رشد باکتری آگروباکتریوم) در محیط انتخابی استفاده شد. ابتدا تک کلونی از باکتری *آگروباکتریوم* به محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین انتقال داده شد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت یک شب در دستگاه شیکر انکوباتور با

[1] - Explant

سرعت ۱۵۰rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سوسپانسیون باکتری به داخل فالکون منتقل و توسط سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۲۵۰۰rpm رسوب داده شد. فاز رویی باکتری را دور ریخته و رسوب آن را نگه داشته و به آن محیط کشت مورد استفاده برای تلقیح (MS مایع) اضافه نموده تا به حجم ۱۰ میلی لیتر رسید. برای افزایش تراکم باکتری و OD بیشتر می‌توان پس از کشت شبانه در داخل هر فالکون عمل رسوب باکتری با سانتریفیوژ را دو مرتبه تکرار کرد. امولسیون باکتری و محیط کشت تلقیح مایع را به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر-انکوباتور با سرعت ۱۵۰rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا باکتری به محیط کشت عادت کرده و ما بین OD = 0.6-0.8 شود. در شرایط استریل امولسیون باکتری و محیط کشت به پتری دیش‌های حاوی برگ‌های برش‌خورده توتون انتقال داده شد. پس از قرار دادن ریزنمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محیط تلقیح با استفاده از کاغذ صافی استریل سوسپانسیون باکتری را حذف و ریزنمونه‌ها روی کاغذ صافی خشک شدند. سپس ریز نمونه‌ها را به محیط هم کشتی (محیط MS حاوی هورمون BAP و NAA و فاقد آنتی‌بیوتیک)، منتقل و به مدت ۲ روز در تاریکی و دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا آلودگی توسط *آگروباکتریوم* انجام پذیرد. پس از طی شدن طول دوره کشت هم زمان ریزنمونه‌ها را به محیط کشت باززایی انتخابی که دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به میزان mgl^{-1} ۵۰۰ و کانامایسین به میزان mg^{-1} ۲۵ و mgl^{-1} ۱ هورمون BAP و mgl^{-1} ۰.۱ هورمون NAA انتقال داده شد و به مدت دو هفته در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از دو هفته گیاهچه‌های باززا شده را از ریز نمونه در شرایط استریل جدا کرده و به محیط انتخابی دوم حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به میزان mgl^{-1} ۵۰۰ و کانامایسین به میزان mgl^{-1} ۵۰ و هورمون‌ها با مقادیر ذکر شده منتقل شدند. هر دو هفته یک بار عمل واکشت بر روی محیط کشت باززایی انتخابی صورت پذیرفت. و مقادیر آنتی بیوتیک کانامایسین تا ۷۵ و mgl^{-1} ۱۰۰ در هر بار واکشت افزایش یافت. بعد از هشت هفته ساقه‌های باززا شده در محیط حاوی

کانامایسین احتمالاً تراریخت می‌باشند. در این مرحله گیاهچه‌ها را به محیط ریشه‌زایی محیط MS ۱/۲حاوی mgl^{-1} ۵۰۰ سفوتاکسیم و mgl^{-1} ۵۰ کانامایسین بدون هورمون انتقال می‌دهیم.

۳-۱۴-۴ استخراج DNA ژنومی از گیاهان تراریخته احتمالی

استخراج DNA ژنومی، از برگ‌های گیاه توتون تراریخته احتمالی و شاهد استفاده شد. DNA ژنومی همانطور که در بخش (۳-۶-۱) ذکر شد استخراج گردید.

۳-۱۴-۵ استخراج RNA

جداسازی RNA کل از برگ‌های گیاه توتون تراریخت احتمالی با استفاده از کیت RNA-X plus شرکت سیناژن انجام شد.

۳-۱۴-۶ سنتز cDNA

سنتز cDNA همانطور که در بخش ۳- ۹-۱ گفته شد، انجام گرفت.

۳-۱۴-۷ انجام واکنش PCR برای DNA و cDNA گیاه تراریخت احتمالی حاوی سازه ژنی *Napin + Δ15de*

جهت تایید انتقال سازه مورد نظر به گیاه توتون واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Δ15de* و آغازگرهای داخلی طراحی شده *Napin + Δ15de* برای DNA و RNA کل استخراج شده، انجام گرفت.

۳-۱۵ بررسی بیوانفورماتیکی ژن *Δ15de*

توالی نوکلئوتیدی حاصل با استفاده از سایت‌های زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

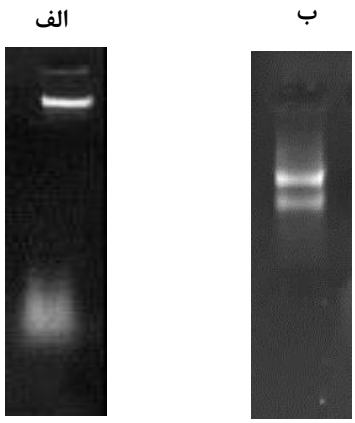
با استفاده از نرم‌افزارهای: EXPASY (htt://expasy.org/tools), NCBI (htt://www.ncbi.nih.gov), Signalp,(http://www.cbs.dtu.dk/services/signal) TMHMM,(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) توالی حاصل با توالی موجود در NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. خصوصیات بیوشیمیایی بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار(http:www.expasy.org/cgi-bin/ProtParam) ProtParam و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای پیش‌بینی ساختار دوم از (http://128.16.10.201/psipred/psiform.html) Psipred و sopma (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/sopma.html) استفاده شد. دومین پروتئینی *Δ15de* از بانک اطلاعاتی pFam با آدرس اینترنتی (http://pfam.xfam.org/search/sequence) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین درختچه فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار (http://www.genome.jp/tools/clustalw) ClustalW رسم گردید.

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱ بررسی نتایج استخراج DNA و RNA

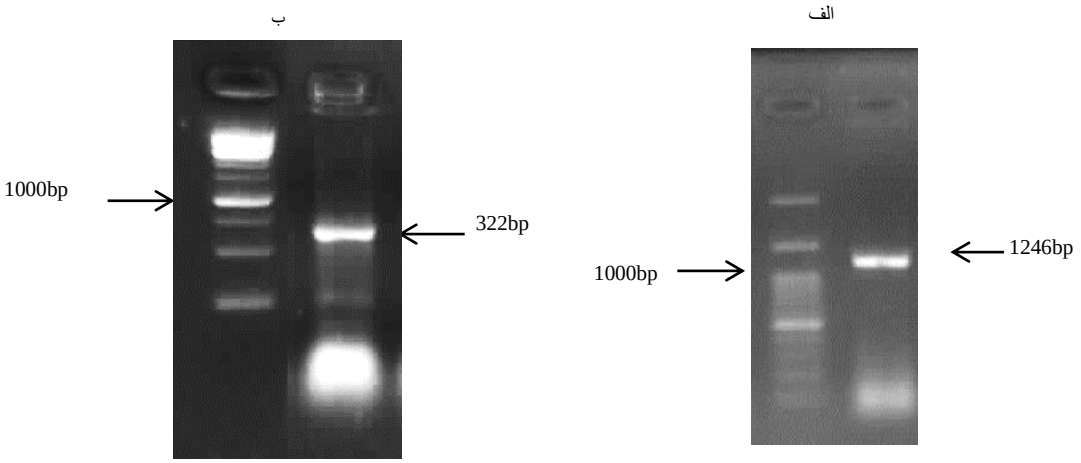
همانطور که ذکر شد DNA ژنومی به روش CTAB (شکل الف، ۴-۱) و RNA کل بـه روش فنل گرم (شکل ب۴،-۱) از مخمر *P.pastoris* استخراج شد. استخراج DNA و RNA سالم برای تهیه الگوی PCR الزامی است که در این روش DNA ژنـومی و RNA اسـتخراج شـده سـالم و در غلظـت مناسب به دست آمد.



شکل ۴-۱ الف: الگوی باندی حاصل از استخراج DNA به روش CTAB ، ب: الگوی باندی استخراج RNA به روش فنل گرم

۴-۱-۱ بررسی نتایج حضور ژن *دلتا۱۵دسچوراز (Δ15de)* از DNA استخراج شده

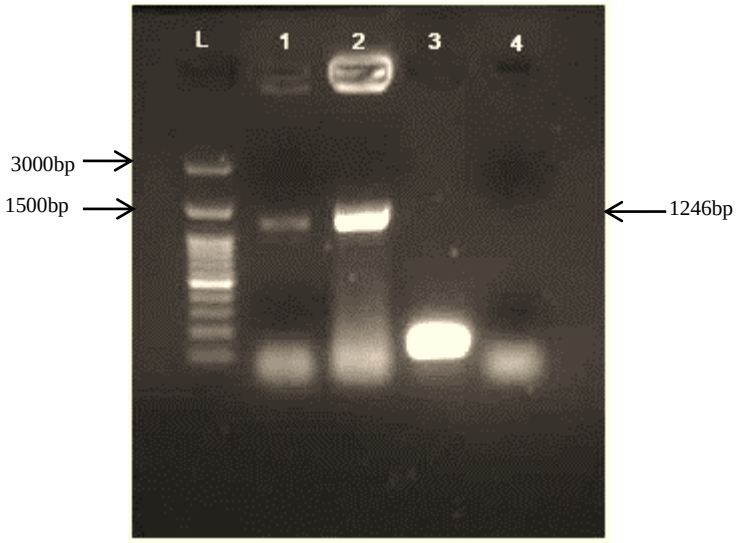
به منظور بررسی حضور ژن *Δ15de* در سطح ژنوم مخمـر واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز بـا پرایمرهـای اختصاصی ژن *Δ15de* (FW، RW) و پرایمرهای مربوط بـه تـوالی داخلـی ایـن ژن(IFWD, IRWD) طراحی شده صورت گرفت. محصول PCR توسط ژل آگارز الکتروفورز مـورد بررسـی قـرار گرفـت کـه نتایج آن به ترتیب تکثیر قطعاتی به طول ۱۲۴۶ جفت باز که مطابق با طول اصلی ژن دلتا۱۵ دسچوراز و ۳۲۲ جفت باز ناشی از تکثیر قسمتی از توالی داخلی این ژن بود (شکل۴-۲).



شکل ۴-۲ الف: محصول PCR حاصل از تکثیر پرایمرهای اختصاصی ژن *Δ15de* (RW، FW) ، ب: محصول PCR حاصل از تکثیر پرایمرهای داخلی (IFWD, IRWD)

۴-۲ بررسی نتایج تکثیر ژن *Δ15de* با استفاده از cDNA سنتز شده

به منظور تکثیر ژن *Δ15de* از cDNA حاصل از مخمر *P.pastoris* استفاده شد. ژن از cDNA جدا شد تا تنها قسمت‌های کارکردی ژن تکثیر شود. طول cDNA که در پایگاه داده‌ها NCBI گزارش گردیده ۱۲۴۶ جفت باز می‌باشد. همانطور که در شکل (۴-۳) نشان داده شده است ژن *Δ15de* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و توسط PCR تکثیر شده است. محصول این PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ قرار گرفته است. طول قطعه ۱۲۴۶ جفت باز است.



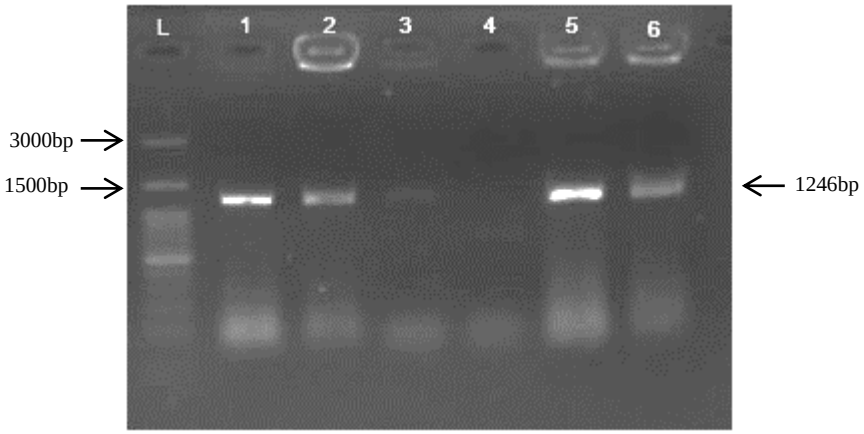
شکل۴-۳ نتایج تکثیر ژن *Δ15de* از cDNA، به ترتیب: در چاهک شماره ۱ و ۲ قطعات مربوط به ژن *Δ15de* به طول ۱۲۴۶ bp می‌باشد. چاهک شماره ۳ کنترل مثبت که نشانگر کارکرد صحیح واکنش PCR و چاهک شماره ۴ کنترل منفی می‌باشد.

۴-۳ غربال‌گری کلون‌های حاوی سازه نوترکیب *pTZ57R/T : Δ15de*

قطعه تکثیری بعد از انجام خالص سازی از ژل آگارز، توسط آنزیم T4 لیگاز درون ناقل *pTZ57R/T* الحاق شد. انتقال سازه به باکتری *E.coli* سویه DH5α به روش شوک حرارتی صورت گرفت و پس از رشد تک کلون‌ها بر روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین غلظت ۵۰ mg/ml برای تایید بیشتر حضور سازه در تک کلون رشد کرد. تعدادی از تک کلون‌ها برای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. باکتری‌های تراریخت شده بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین رشد داده شدند.

۴-۳-۱ تایید حضور ژن *Δ15de* در ناقل *pTZ57R/T* با انجام کلونی PCR

برای حصول اطمینان بیشتر عمل PCR برای قطعات کلون شده با آغازگرهای اختصاصی انجام شد و محصولات آن نیز بر روی ژل آگارز ۱٪ کنترل گردید. (شکل۴-۴) حضور تک باند در منطقه قابل پیش‌بینی (۱۲۴۶bp) که می‌تواند دلیلی بر تراریخت بودن کلون‌های باکتری باشد.



شکل ۴-۴ تایید پلاسمیدهای حاوی ژن *Δ15de* به روش کلونی *PCR* ، L مارکر مولکولی pb ۳۰۰۰ ، چاهک‌های ۱،۲،۵،۶ حاوی قطعه bp ۱۲۴۶ که نوترکیبی این کلون‌ها تایید شد. چاهک‌های ۳،۴ کلون‌های فاقد پلاسمید نوترکیب بودند.

۴-۳-۲ تایید سازه از طریق توالی‌یابی

نتایج بدست آمده از توالی‌یابی با توالی ژن بدست آمده از پایگاه اینترنتی NCBI تقریبا به طور کامل هماهنگی داشت. همچنین توالی ژن کلون شده با توالی ژن بدست آمده از پایگاه داده NCBI مقایسه گردید (شکل۴-۵). نتایج حاصل نشان دهنده‌ی صحت ساخت سازه *pTZ57R/T:Δ15de* است.

```
Query  1     ATGTCAAAAGTCACTGTTTCGGGTTCAGAGATCCTAGAAGGGTCCACCAAGACCGTCAGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     ATGTCAAAAGTCACTGTTTCGGGTTCAGAGATCCTAGAAGGGTCCACCAAGACCGTCAGA  60

Query  61    CGTTCAGGAAACGTTGCTTCTTTCAAGCAACAGAAAACTGCCATCGATACGTTTGGTAAT  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    CGTTCAGGAAACGTTGCTTCTTTCAAGCAACAGAAAACTGCCATCGATACGTTTGGTAAT  120

Query  121   GTTTTCAAAGTGCCAGATTACACCATCAAAGATATCCTAGACGCCATTCCAAAACACTGC  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   GTTTTCAAAGTGCCAGATTACACCATCAAAGATATCCTAGACGCCATTCCAAAACACTGC  180

Query  181   TATGAAAGATCTTTGGTCAAGTCGATGTCCTACGTCGTCAGGGATAT-GTTGCTATTTTC  239
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| ||||
Sbjct  181   TATGAAAGATCTTTGGTCAAGTCGATGTCCTACGTCGTCAGGGATATTGTTGCTA-TTTC  239

Query  240   TGCTATTGCCTACGTGGGCCTAACTTACATCCCTCTGCTGCCAAACGAGTTTTCTTCG-T  298
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| |
Sbjct  240   TGCTATTGCCTACGTGGGCCTAACTTACATCCCTCTGCTGCCAAACGAGTTT-CTTCGTT  298

Query  299   TTGCTGCTTGGAGTGCGTATGTGTTCAGTATTTCTTGTTTTGGATTCGGAATTTGGATTC  358
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  299   TTGCTGCTTGGAGTGCGTATGTGTTCAGTATTTCTTGTTTTGGATTCGGAATTTGGATTC  358

Query  359   TTGGACACGAATGCGGTCACTCTGCCTTCAGCAACTATGGCTGGGTTAACGACACGGTCG  418
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  359   TTGGACACGAATGCGGTCACTCTGCCTTCAGCAACTATGGCTGGGTTAACGACACGGTCG  418

Query  419   GCTGGGTTCTTCATTCCCTGGTAATGGTTCCATATTTTTCTTGGAAGTTCTCCCATGCCA  478
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  419   GCTGGGTTCTTCATTCCCTGGTAATGGTTCCATATTTTTCTTGGAAGTTCTCCCATGCCA  478

Query  479   AGCACCACAAGGCAACAGGTCATATGACCAGAGACATGGTCTTTGTTCCATACACCGCTG  538
             |||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  479   AGCATCATAAGGCAACAGGTCATATGACCAGAGACATGGTCTTTGTTCCATACACCGCTG  538

Query  539   AGGAGTTCAAGGAAAAACACCAAGTTACTAGTCTGCACGATATTGCAGAGGAAACTCCTA  598
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  539   AGGAGTTCAAGGAAAAACACCAAGTTACTAGTCTGCACGATATTGCAGAGGAAACTCCTA  598

Query  599   TTTATTCAGTTTTTGCCCTTTTGTTTCAACAGCTCGGAGGACTCAGTTTGTATCTTGCCA  658
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  599   TTTATTCAGTTTTTGCCCTTTTGTTTCAACAGCTCGGAGGACTCAGTTTGTATCTTGCCA  658

Query  659   CGAATGCTACTGGTCAACCGTATCCCGGGGGTGTCCAAGTTCTTCAAAAGTCATTACTGGC  718
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  659   CGAATGCTACTGGTCAACCGTATCCCGGGGGTGTCCAAGTTCTTCAGAAGTCATTACTGGC  718

Query  719   CATCCTCTCCTGTTTTTGATAAGAAGGACTATTGGTACATTGTTCTGAGTGACCTGGGAA  778
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  719   CATCCTCTCCTGTTTTTGATAAGAAGGACTATTGGTACATTGTTCTGAGTGACCTGGGAA  778

Query  779   TCTTGGCAACCCTGACTAGTGTTTACACTGCTTACAAAGTGTTCGGATTTTGGCCCACAT  838
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  779   TCTTGGCAACCCTGACTAGTGTTTACACTGCTTACAAAGTGTTCGGATTTTGGCCCACAT  838

Query  839   TCATTACTTGGTTTTGCCCTTGGATTTTGGTCAACCACTGGCTGGTATTTGTCACCTTCC  898
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  839   TCATTACTTGGTTTTGCCCTTGGATTTTGGTCAACCACTGGCTGGTATTTGTCACCTTCC  898

Query  899   TACAACACACAGACTCGTCCATGCCTCACTACGATGCCCAAGAATGGACTTTCGCCAAAG  958
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  899   TACAACACACAGACTCGTCCATGCCTCACTACGATGCCCAAGAATGGACTTTCGCCAAAG  958

Query  959   GTGCCGCCGCCACAATTGATAGAGAATTTGGTATCTTAGGAATTATATTTCACGACATTA  1018
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  959   GTGCCGCCGCCACAATTGATAGAGAATTTGGTATCTTAGGAATTATATTTCACGACATTA  1018

Query  1019  TCGAAACTCACGTTTTGCACCACTATGTTAGTAGAATTCCATTCTACCATGCTAGAGAGG  1078
             ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1019  TCGAAACCCACGTTTTGCACCACTATGTTAGTAGAATTCCATTCTACCATGCTAGAGAGG  1078

Query  1079  CTACTGAGTGCATTAAGAAGGTTATGGGCGAACATTACCGTCACACTGACGAGAACATGT  1138
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1079  CTACTGAGTGCATTAAGAAGGTTATGGGCGAACATTACCGTCACACTGACGAGAACATGT  1138

Query  1139  GGGTCAGTCTCTGGAAGACCTGGAGGTCGTGCCAGTTTGTTGAGAACCATGATGGTGTGT  1198
             ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1139  GGGTCAGTCTCTGGAAAACCTGGAGGTCGTGCCAGTTTGTTGAGAACCATGATGGTGTGT  1198

Query  1199  ACATGTTCAGAAACTGCAACAATGTT-GTGTTAAACCTAAGGATACCTAA  1247
             |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  1199  ACATGTTCAGAAACTGCAACAATGTTGGTGTTAAACCTAAGGATACCTAA  1248
```

شکل ۴-۵ همسانی نتایج توالی‌یابی با توالی موجود در NCBI با توالی اصلی Blast (Align) گردید.(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

Exepasy translate ۴-۴

توالی نوکلئوتیدی حاصل با استفاده از سایت Expasy translate به توالی پروتئینی ترجمه گردید، که توالی حاصل دارای ۴۵ آمینواسید می‌باشد که مطابق با توالی پروتئینی موجود در NCBI مربوط به ژن *دلتا۱۵ دسچوراز* می‌باشد(جدول۴-۱).

جدول۴-۱ توالی آمینواسیدی ژن دلتا۱۵دسچوراز (کلون شده) حاصل از ترجمه توالی نوکلوئتیدی این ژن توسط سایت Expasy translate

```
>VIRT26852
MSKVTVSGSEILEGSTKTVRRSGNVASFKQQKTAIDTFGNVFKVPDYTIKDILDAIPKHC
YERSLVKSMSYVVRDMLLFSAIAYVGLTYIPLLPNEFSSFAAWSAYVFSISCFGFGIWIL
GHECGHSAFSNYGWVNDTVGWVLHSLVMVPYFSWKFSHAKHHKATGHMTRDMVFVPYTAE
EFKEKHQVTSLHDIAEETPIYSVFALLFQQLGGLSLYLATNATGQPYPGVSKFFKSHYWP
SSPVFDKKDYWYIVLSDLGILATLTSVYTAYKVFGFWPTFITWFCPWILVNHWLVFVTFL
QHTDSSMPHYDAQEWTFAKGAAATIDREFGILGIIFHDIIETHVLHHYVSRIPFYHAREA
TECIKKVMGEHYRHTDENMWVSLWKTWRSCQFVENHDGVYMFRNCNNVGVKPKDT
```

ProtParam ۱-۴-۴

برای محاسبه خصوصیات بیوشیمیایی توالی پروتئنی می‌توان از سایت ProtParam استفاده کرد. پارامترهای محاسبه شده توسط این نرم‌افزار شامل: وزن مولکولی، PI فرضی (نقطه ایزوالکتریک)، ترکیب اسیدآمینه‌ای، ترکیب اتمی، ضریب خاموشی، تخمین نیمه عمر، شاخص بی‌ثباتی، شاخص آلیفاتیک است. این آنزیم دارای ۴۱۵ آمینواسید، با وزن مولکولی ۴۷۷۷۲/۷ ، دارای PI ۷/۰۸ و فرمول مولکولی: $C_{2223}H_{3266}N_{552}O_{594}S_{17}$ و ضریب اتمی ۶۶۵۲ است. تعداد کل رزیدوها از نظر بار منفی (Asp + Glu)=36 و از نظر بار مثبت (Arg+ Lys)=35 می‌باشد. ترکیبات اتمی در (جدول۴-۲) مشاهده می‌شود.

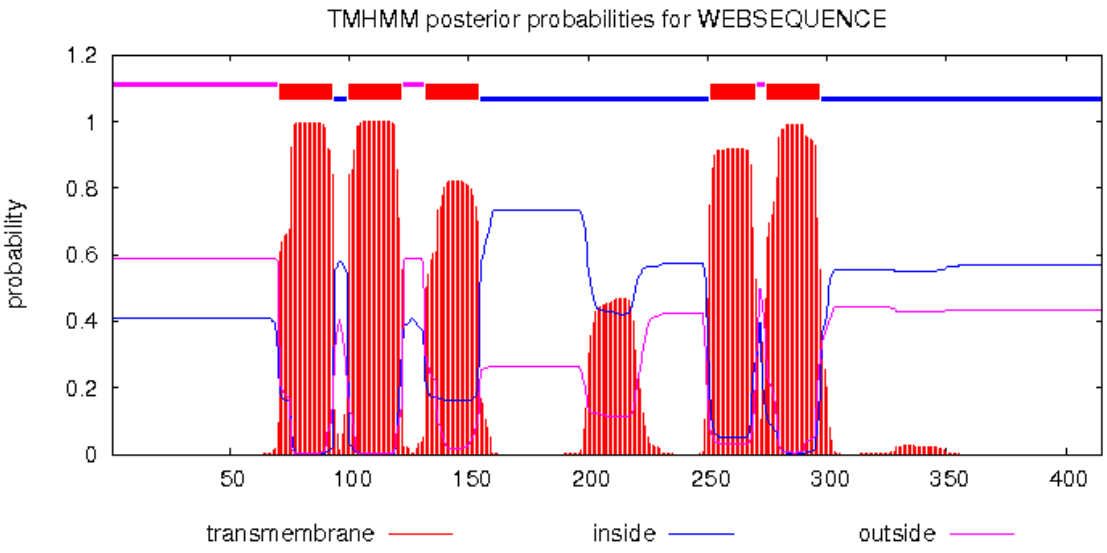
جدول۴-۲ ترکیبات اتمی تشکیل دهنده ژن *Δ15de*

Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Oxygen	Sulfur
2223	3266	552	594	17

ضریب خاموشی نشان دهنده میزان جذب نور در یک طول موج خاصی توسط یک پروتئین می‌باشد. میزان ضریب خاموشی این پروتئین ۱۱۵۶۵۵ محاسبه گردید. برآورد نیمه عمر یک پروتئین مقدار زمان باقی‌ماندن یک پروتئین در سلول پس از سنتز را نشان می‌دهد که این مدت زمان بستگی به انتهای N هر پروتئین دارد. این مدت زمان در مخمر ۲۰ ساعت می‌باشد. شاخص ناپایداری پروتئین‌ها بیانگر میزان پایداری آن‌ها در لوله آزمایش می‌باشد و پروتئین‌های با شاخص کمتر از ۴۰ جزء پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شوند. آنزیم *دلتا۱۵ دسچوراز* موجود در مخمر *پیکیاپاستوریس* دارای شاخص ناپایداری ۳۵/۷۵ می‌باشد که جزء پروتئین‌های پایدار محسوب می‌شود. شاخص آلیفاتیک ۸۰/۰۵ محاسبه گردید.

TMHMM ۲-۴-۴

بر طبق مطالعات انجام شده اکثر دسچورازها دارای هلیکس‌های ترانس‌ممبرانی می‌باشند. به طور مثال مطالعات انجام گرفته بر روی *دلتا۱۲دسچوراز* نشان دهنده وجود هلیکس‌های ترانس-ممبرانی در این پروتئین می‌باشد. بر اساس تحقیقات انجام شده بر روی ایزوفرم‌های مختلف *دلتا۱۲ دسچوراز* تعداد این هلیکس‌ممبران‌ها در انواع مختلف متفاوت می‌باشد. نتایج حاصل از این سایت این پروتئین را جزء پروتئین‌های غشائی طبقه‌بندی می‌کند که دارای ۵ هلیکس ترانس‌ممبرانی می-باشد(جدول۴-۳ و شکل ۴-۶).



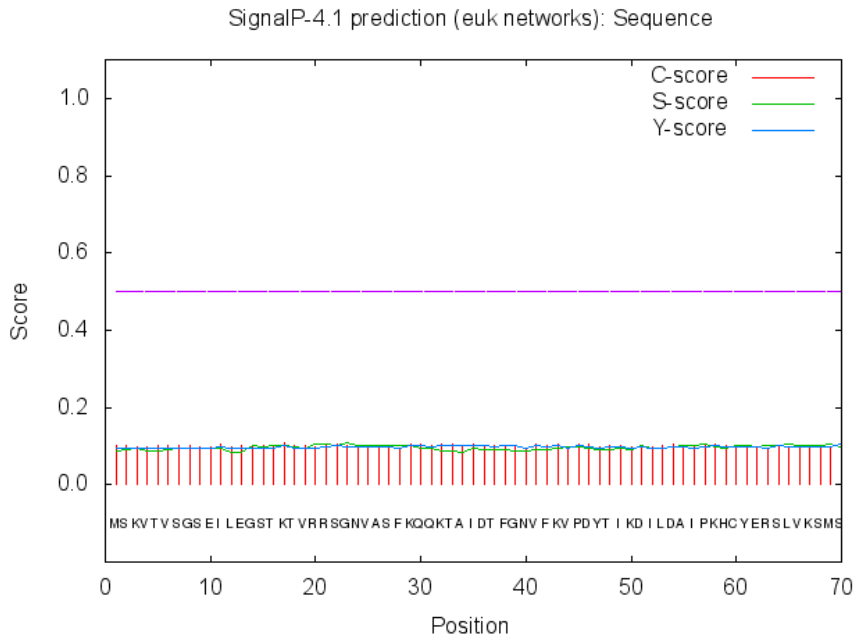
شکل۴-۶ پیش‌بینی ترانس‌ممبران ژن *Δ15de*

جدول۴-۳ تعداد ترانس‌ممبران‌های *Δ15de*

TMhelix	71-93	100-122	132-154	251-270	275-297
outside	1-70	123-131	271-274		
inside	94-99	155-250	298-415		

SignalP ۳-۴-۴

بر اساس داده‌های حاصل از SignalP این پروتئین فاقد سیگنال پپتید می‌باشد و یک پروتئین غشائی با دومین‌های گذرنده از غشاء می‌باشد (شکل۴-۷).

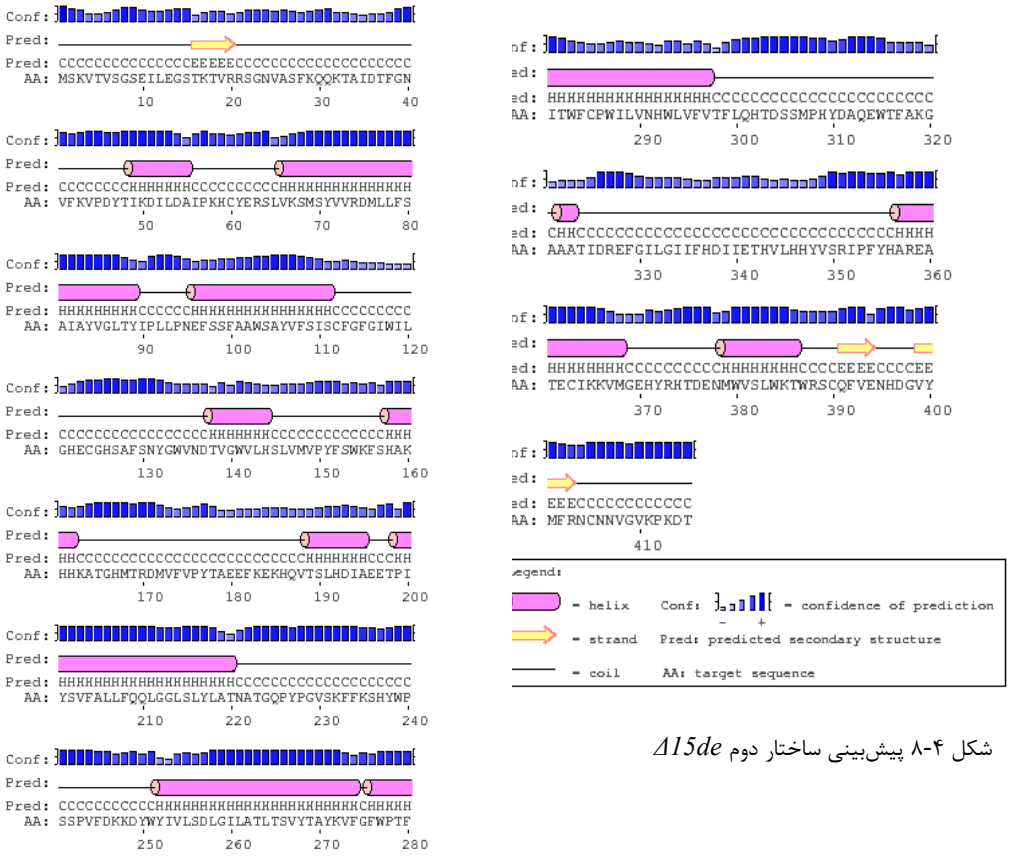


شکل ۴- ۷پیش‌بینی SignalP ژن *Δ15de*

۴-۵ Psipreid

اطلاعات ساختاری از دسچورازهای غشائی به دلیل وجود محدودیت‌های تکنیکی در به دست آوردن مقدار پروتئین خالص و مشکلات درونی در بدست آوردن ساختار کریستالی پروتئین‌های غشائی دسچورازها در دسترس نمی‌باشد. *دلتا۹دسچوراز* تنها پروتئین محلول دسچورازی می‌باشد و تنها دسچورازی است که توسط اشعه X ساختار کریستالوگرافی آن مشخص شده است. ساختار سه بعدی دلتا۹دسچوراز نشان می‌دهد که در این پروتئین حامل آسیل- استرول ۱۱ آلفا هلیکس و یک پارآلل بتا شیت حضور دارد. برای پیش‌بینی ساختار دوم از Psipred استفاده شد. پیش‌بینی ساختار دوم توالی پروتئین *Δ15de* شامل: آلفا هلیکس، صفحاتβ، لوپ‌ها می‌باشد. پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین اولین قدم در درک ساختار سوم و در نهایت عملکرد آن است. دانستن ساختار دوم کمک به پیش‌بینی لوپ‌ها، رزیدوها می‌کند (شکل ۴-۸). این شکل آخرین آنالیزها از خروجی نمودارهای PSIPRED را نشان می‌دهد.

این نمودار توالی مورد جست وجو را با الگوی از ساختار دوم و ارزش ضریب احتمال در هر موقعیت همترازی را تفسیر می‌کند. ضریب احتمال را به صورت یکسری از نمودارهای نوار آبی رنگ داده شده است.



شکل ۴-۸ پیش‌بینی ساختار دوم *Δ15de*

طرح رامچاندران از این مدل نشان داد که ۹۸/۵٪ از رزیدوها در نواحی مجاز قرار گرفته‌اند (۷۳/۵٪ بیشترین سازگاری را دارند و۱۵٪ در نواحی مجاز اضافی هستند) در حالی که ۱/۵٪ در سمت نواحی مجاز قرار دارند، که نشان‌دهنده یک ساختار با ثبات هستند (۳۶). شکل کلی تمامی مدل‌های دلتا۱۵دساچوراز شامل یک استوانه فشرده حاوی ۱۲-۱۰ α هلیکس و ۲-۱ صفحات غیر مشابه (آنتی پارآلل) β هستند. در تمامی مدل‌های αهلیکس یکی کوتاه(α1) و یکی بلند (α6) است. هلیکس‌های α2 و α4 توسط یک یا دو هلیکس غیر همشکل آمینواسیدی از هم جدا شده‌اند.

Sopma ۱-۵-۴

یک روش برای پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین می‌باشد. در این روش تا ۶۹٪ از ساختار دوم اسیدهای آمینه (مارپیچ آلفا، بتا و سوپرکویل) می‌توان پیش‌بینی کرد. نتایج پیش‌بینی مارپیچ آلفا، بتا و سوپرکویل‌های مربوط به ژن *Δ15de* مشاهده می‌شود. بر طبق نتایج بدست آمده دارای ۳۸.۸۰٪ آلفاهلیکس، ۷.۷۱٪ مارپیچ بتا و ۳۲.۰۵٪ از سوپرکویل می‌باشد شکل (الف،ب۴-۹).

الف

```
        10         20         30         40         50         60         70
         |          |          |          |          |          |          |
MSKVTVSGSEILEGSTKTVRRSGNVASFKQQKTAIDTFGNVFKVPDYTIKDILDAIPKHCYERSLVKSMS
heeeeeccceeehtcchheeecttceeeehtcccchhhhttceeccccchhhhhhhccccchhhhhhhhhh
YVVRDMLLFSAIAYVGLTYIPLLPNEFSSFAAWSAYVFSISCFGFGIWILGHECGHSAFSNYGWVNDTVG
hhhhhhhhhhhhheetceeccccchhhhhhhhhhhheeeeccccceeeeecccccccccctteeecchhhh
WVLHSLVMVPYFSWKFSHAKHHKATGHMTRDMVFVPYTAEEFKEKHQVTSLHDIAEETPIYSVFALLFQQ
hhhhheeeecccceeeecccccccttcccchteeecccchhhhcchhhhhhhhhhtcccchhhhhhhhhhh
LGGLSLYLATNATGQPYPGVSKFFKSHYWPSSPVFDKKDYWYIVLSDLGILATLTSVYTAYKVFGFWPTF
ttcceeeeecccccccccccceeeecccccccccctteeeeehhhhhhhhhhhhhhhhhheetccccc
ITWFCPWILVNHWLVFVTFLQHTDSSMPHYDAQEWTFAKGAAATIDREFGILGIIFHDIIETHVLHHYVS
eeeecctehhhhheeeeeeccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhteeeeeehhhhhhhhhhhhht
RIPFYHAREATECIKKVMGEHYRHTDENMWVSLWKTWRSCQFVENHDGVYMFRNCNNVGVKPKDT
tccccchhhhhhhhhhhhhhtccccchhheeehhhhcchheeectttceeeeeettttccccccc
```

ب

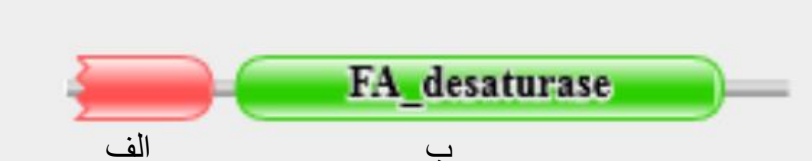
```
Sequence length :   415

SOPMA :
   Alpha helix      (Hh) :   161 is  38.80%
   3₁₀  helix       (Gg) :     0 is   0.00%
   Pi helix         (Ii) :     0 is   0.00%
   Beta bridge      (Bb) :     0 is   0.00%
   Extended strand  (Ee) :    89 is  21.45%
   Beta turn        (Tt) :    32 is   7.71%
   Bend region      (Ss) :     0 is   0.00%
   Random coil      (Cc) :   133 is  32.05%
   Ambiguous states (?)  :     0 is   0.00%
   Other states          :     0 is   0.00%
```

شکل ۴-۹ میزان سوپرکویل‌ها، مارپیچ بتا و آلفاهلیکس‌های موجود در ژن *Δ15de*

۴-۶ –بررسی دومین ژن *Δ15de* به کمک سایت pfam

دومین پروتئینی *Δ15de* از بانک اطلاعاتی pfam مورد بررسی قرار گرفت (شکل۴-۱۰) این سایت دومین‌های توالی مورد نظر را نشان می‌دهد. ژن دلتا۱۵ دسچوراز دارای دو دومین (یک دومین FA desaturase و یک دومین با کارکرد ناشناخته Domain of unknown function (DUF3474) بود.



شکل ۴-۱۰دو دومین ژن *Δ15de* ، الف: دومین ناشناخته Domain of unknown function ، ب: دومین FA-desaturase

مطالعاتی که توسط زینتی و همکاران به منظور بررسی اساس مولکولی اسید آلفا لینولنیک پایین و بالا، بر روی توالی‌های ژنی کد کننده ω3fatty acid desaturase در گیاهان مختلف انجام گرفته و ساختار پروتئینی آنزیم *Δ15de* و دومین‌های موثر در فعالیت این آنزیم مرود بررسی قرار گرفته است. نتایج آنها نشان داد که همه امگا۳ دسچورازها دارای دو دومین (significant pfam-a) یک دومین FAdesaturase و یک دومین با کارکرد ناشناخته (Domain of unknown function(DUF3474) بودند. آنها بیان کردند که در کتان با میزان آلفا لینولنیک اسید۵۵٪ علاوه بر دومین FA-desaturase و یک دومین با کارکرد ناشناخته، یک دومین Foamy وجود دارد. آنها بیان کردند که ممکن است دلیل افزایش ALA در کتان وجود دومین Foamy-BEL باشد/ دانه‌های کتان روغنی غنی از ALA با حساسیت بالا به اکسیداسیون تولید می‌کند. پایداری اکسیداتیو پایین استفاده آن را به عنوان روغن خوراکی محدود کرده است.

بنابراین، شاید بتوان با جلوگیری از فعالیت این دومین میزان ALA را کاهش داد. همچنین شاید بتوان از طریق مهندسی ژنتیک با انتقال این دومین به گیاهانی که میزان ALA آن پایین است میزان آن را افزایش داد. همچنین در *Perilla frutescens* با میزان آلفا لینولنیک ۵۸٪ علاوه بر دومین FA- desaturase و یک دومین ناشناخته، دو دومین FA- Desaturase وHum- adeni- E3A نیز وجود دارد. خانواده Hum- adeno- E3A شامل تعدادی از گلیکوپروتئین‌های اولیه از adenoviruses انسانی می‌باشد. دسچوراز آنزیمی است که دو اتم هیدروژن را از اسید چرب حذف کرده و یک باند دوگانه کربن-کربن ایجاد می‌کند. از آنجا که دو دومین Hum-ADENO E3A نیز در کنجد وجود دارد ولی میزان ALA آن ۰-۵٪ است، می‌توان نتیجه گرفت وجود دو دومین FA- Desaturase وHum- adeno- E3A به طور همزمان برای افزایش آلفا لینولنیک اسید ضروری است (۱۰۱). نتایج آنها نشان دهنده عدم ارتباط این سه دومین با دومین‌های دیگر و در نتیجه مستقل عمل کردن آن‌ها می‌باشد. در صورتی که بخواهیم از این ناحیه کار کردی برای افزایش میزان ALA استفاده کنیم این نتایج می-تواند مطلوب باشد. به این دلیل که برای افزایش میزان این اسید چرب دیگر نیاز به انتقال دومین‌های در واکنش با آن نیست. در نتیجه این سه دومین بدون داشتن بر همکنشی با دومین‌های دیگر به صورت اختصاصی و به تنهایی خودشان عامل ایجاد کننده میزان بالای آلفالینولنیک اسید می‌باشند (۸۹).

۴-۶-۱ بررسی درختچه فیلوژنتیکی

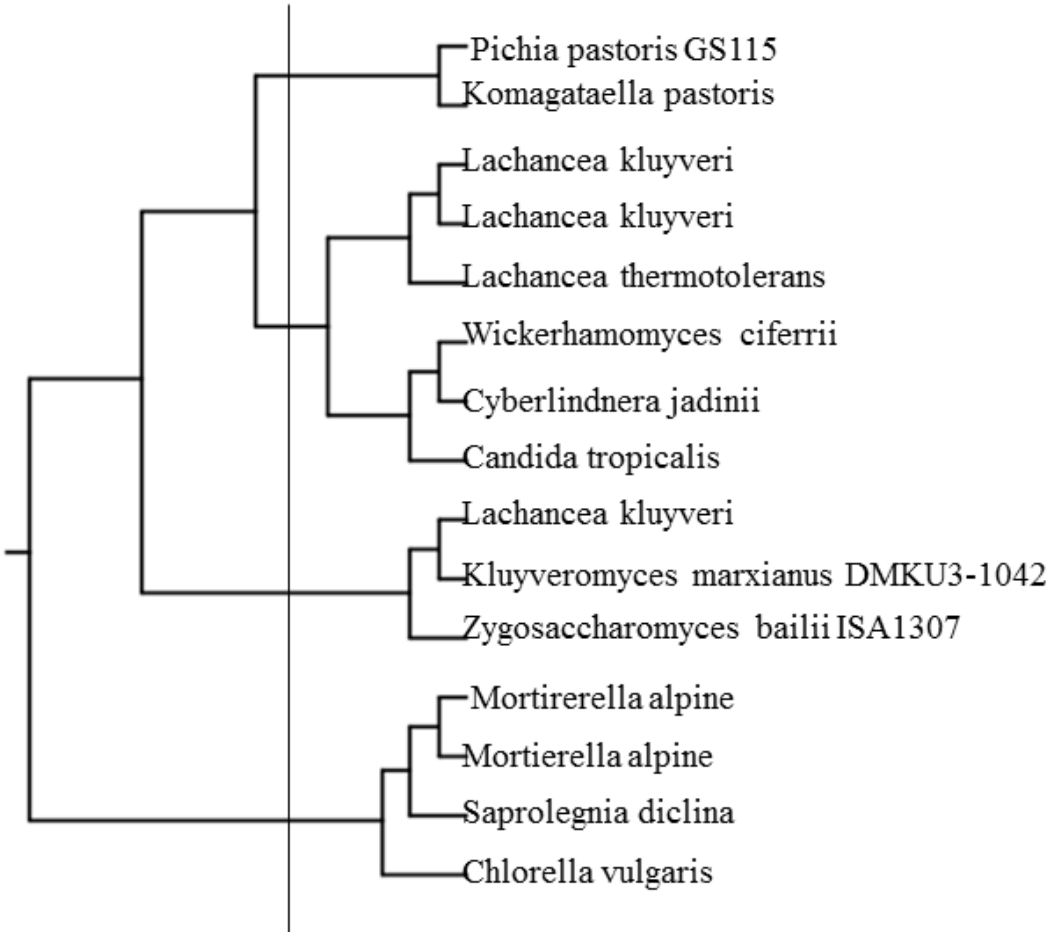
درخت فیلوژنتیک، درخت تکامل نژادی یا درخت تکاملی[1] :یک نمودار انشعابی است (که اصطلاحا درخت (گراف) نامیده می‌شود) و روابط تکاملی در میان گونه‌های مختلف زیستی و یا حتی اشخاص را بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌های فیزیکی(فیلوژنتیک) و یا خصوصیات ژنتیک نشان می‌دهد. واحدهایی

1 - Phylogenetic tree

که به هم در درخت متصل هستند، از یک جد مشترک جدا شده‌اند. در یک درخت تکامل نژادی ریشه‌دار، هر گره نشان دهنده جد مشترکی برای فرزندان آن گره می‌باشد، و طول یال‌ها در برخی از درختان نشان دهنده تخمین زمان است. هر گره یک واحد طبقه بندی (taxonomic) نامیده می‌شود . گره‌های داخلی عموما واحد طبقه بندی فرضی (HTUs) نامیده می‌شوند و نمی‌توان آنها را به طور مستقیم مشاهده کرد. این درختان در زمینه‌های زیست شناسی مانند زیست‌شناسی تکاملی، بیوانفورماتیک، سیستماتیک و فیلوژنتیک مقایسه‌ای کاربرد دارند. بعد از توالی یابی ژن *Δ15de* در گونه پیکیا پاستوریس ،با استفاده از نرم‌افزار BlastP در پایگاه NCBI به بررسی توالی پروتئینی Δ15de در گونه‌های مختلف پرداختیم. در این بررسی ۱۴ گونه با شماره دسترسی:

Pichia pastoris GS115:(VIRT26852), *Komagataella pastoris* :(ABL63813), *Lachancea kluyveri*: (ADE06664), *Lachancea kluyveri* : (BAD11952), *Lachancea thermotolerans*: (XP-002553950), *Wickerhamomyces ciferrii*: (XP_011275445), *Cyberlindnera jadinii*: (BAJ78984),*Candida tropicalis*: (ADN42964), *Lachancea kluyveri* :(BAD08375), *Kluyveromycesmarxianus*:(BAO38850),*Zygosaccharomyces*:(CDH15170),*Mortirerella alpine*:(BAA81754),*Mortierella lpine*: (BAD91495), *Saprolegnia diclina*: (AAR20443), *Chlorella vulgaris*: (BAB78716)

دارای درصد یکسانی بالای ۶۰٪ با این ژن بودند را انتخاب کردیم. درختچه فیلوژنتیکی حاصل (شکل ۴-۱۲) از توالی پروتئینی این ژن‌ها در این ۱۵ گونه با استفاده از نرم‌افزار ClustalW رسم شد و بر طبق نتایج بدست آمده از ژن *Δ15de* در گونه *Pichia pastoris* با ژن دسچوراز در گونه *Komagataella pastoris* در یک کلاستر قرار می‌گیرد.

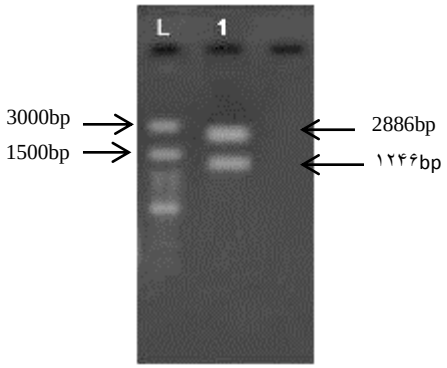


شکل۴-۱۲ درختچه فیلوژنتیکی ژن *Δ15de* توالی‌یابی شده با نمونه‌های گزارش شده در NCBI که توسط نرم‌افزار ClustalW رسم گردیده است.

۴-۶-۲ نتیجه هضم آنزیمی *pTZ57R/T* با دو آنزیم *Sac*I و *Xba*I

به منظورهمسانه‌سازی ژن *Δ15de* درون ناقل *pKS* باید دو انتهای ژن با دو آنزیم *Sac*I و *Xba*I برش داده شود. سایت برشی این دو آنزیم در ابتدا ′۵ هر یک از آغازگرها قرار داده شده است. بعد از هضم آنزیمی *pTZ57R/T* نوترکیب حاوی ژن *Δ15de* با این دو آنزیم برشی (شکل۴-۱۳)، یک قطعه‌ی ۱۲۴۶ جفت بازی و ۲۸۸۶ جفت بازی بر روی ژل الکتروفورز مشاهده شد. قطعه ۱۲۴۶ جفت بازی

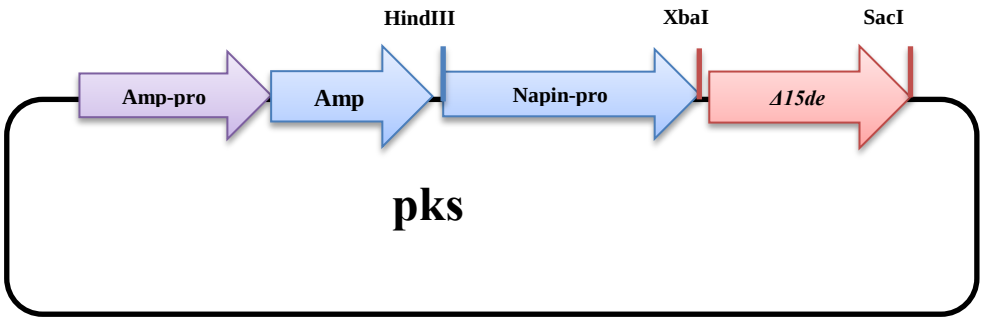
مربوط به ژن *Δ15de* که بدلیل دارا بودن وزن مولکولی کمتر نسبت به قطعه پلاسمید پایین‌تر قرار گرفته است و قطعه ۲۸۸۶ جفت بازی مربوط به پلاسمید *pTZ57R/T* می‌باشد. قطعه ۱۲۴۶ بازی از روی ژل جدا شده و مراحل خالص سازی از ژل انجام گرفت.



شکل ۴-۱۳ نتایج هضم آنزیمی *sac*I و *Xba*I ، قطعه bp ۱۲۴۶ مربوط به ژن *Δ15de* و قطعه bp ۲۸۸۶ مربوط به پلاسمید *PTZ57R/T* ، L: لدر ۳۰۰۰ جفت بازی

۴-۷ غربال‌گری کلون‌های حاوی سازه نوترکیب *pKS:Napin + Δ15de*

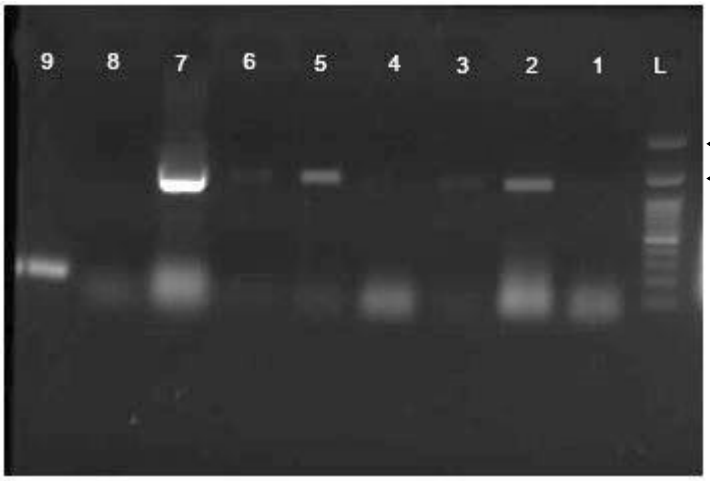
انتقال سازه به باکتری *E.coli* سویه DH5α به روش شوک حرارتی صورت گرفت و پس از رشد تک کلون‌ها بر روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین غلظت ۵۰ mg/ml برای تایید بیشتر حضور سازه در تک کلون رشد کرد. تعدادی از تک کلون‌ها برای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و داخلی استفاده شد. باکتری‌های تراریخت شده بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین (با توجه به ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در پلاسمید *pKS*) رشد داده شدندکه شکل (۴-۱۴) کلون‌های تراریخت شده بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱۴ نمایی از سازه *pKS: Napin+ Δ15de*. ژن مقاومت به آمپی‌سیلین(Amp) به عنوان نشانگر انتخابی است.

۴-۷-۱ تایید کلونی‌های نوترکیب حاوی سازه ژنی *pks: Napin + Δ15de* با انجام کلونی PCR

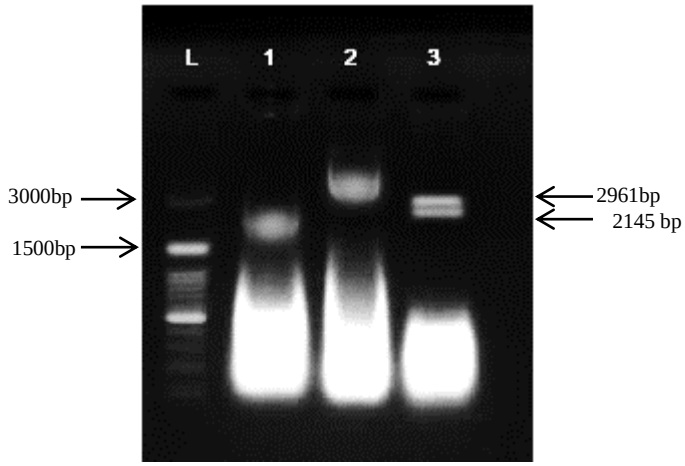
برای اطمینان بیشتر عمل PCR برای قطعات کلون شده با آغازگرهای اختصاصی و داخلی صورت گرفت و محصولات آن نیز بر روی ژل آگارز ۱٪ کنترل گردید. به ترتیب قطعات به طول ۱۲۴۶ جفت باز و ۱۲۱۰ جفت باز در شکل (۴-۱۵) مشاهده می‌شود که گویای حضور پلاسمید نوترکیب *pKS* در باکتری *E.coli* می‌باشد.



شکل ۴-۱۵ نتایج کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای داخلی *Δ15de* و *Napin*، چاهک‌های شماره ۲،۵ باند تکثیر شده قطعه ژنی *Δ15de* ، به ترتیب چاهک ۹ و ۸ کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شماره ۷ نتایج PCR با پرایمر داخلی کلونی L،PCR: لـدر ۳۰۰۰ جفـت بازی.

۴-۷-۲ تایید سازه از طریق هضم آنزیمی توسط دو آنزیم برشی *Hind*III و *Sac*I

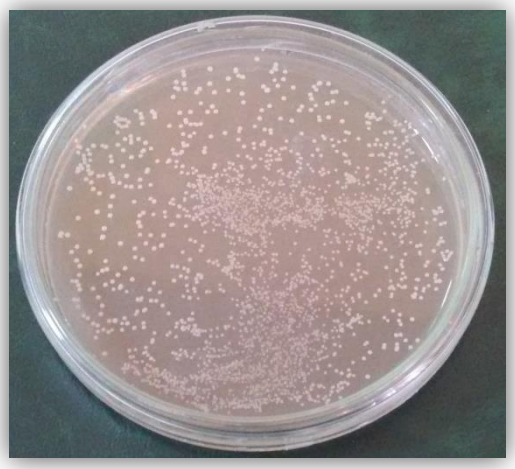
به منظور تایید حضور و الحاق سازه ژنی *Napin+ Δ15d* درون*pKS* و قرار گیری آن در ادامـه تـوالی ژن ناپین هضم آنزیمی بـا دو آنـزیم برشـی *Hind*III و *Sac*I انجـام شـد. همـانطور کـه در شـکل(۴-۱۶)مشاهده می‌شود در چاهک شماره۳ دوباند مشاهده می‌شود که نتیجه هضم آنزیمی می‌باشد. بانـد پایینی مربوط به قطعه *Napin+ Δ15de* ۲۱۴۵جفت باز است که به علت تقریبـا هـم وزن بـودن بـا ناقل *pKS* در نزدیکی هم قرار گرفته‌اند. در صورتی که برش صورت نگرفته باشد بانـد پلاسـمید طـول بیشتری داشته و در روی ژل آگارز بالاتر از ناقل برش خورده قرار می‌گیرد.



شکل ۴-۱۶ چاهک L: لدر، چاهک شماره ۱ استخراج پلاسمید غیر تراریخته، چاهک شماره۳ استخراج پلاسمید نوترکیب، چاهک شماره ۴ نتایج برش حاصل از هضم آنزیمی *Hind*III و *Sac*I را نشان می‌دهد.

۴-۸ غربال‌گری کلون‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب *pBI121* در باکتری *E.coli*

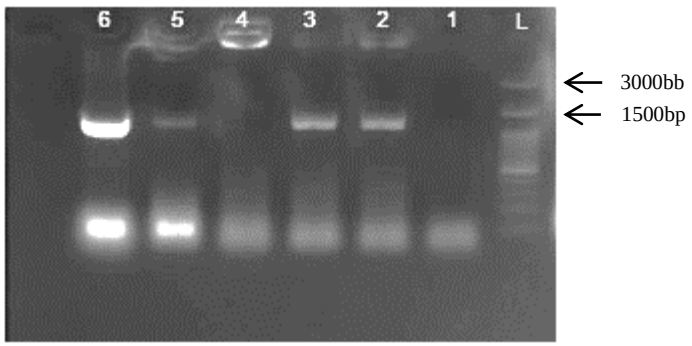
انتقال سازه به باکتری *E.coli* سویه DH5α، به روش شوک حرارتی صورت گرفت و پس از رشد تک کلون‌ها بر روی محیط جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک ۵۰µg/ml کانامایسین برای تایید بیشتر حضور سازه در تک کلون رشد کرده تعدادی از تک کلون‌ها برای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و داخلی استفاده شد. باکتری‌های تراریخت شده بر روی محیط کشت LB حاوی کانامایسین (با توجه به ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین در پلاسمید *pBI121*) رشد داده شدند که شکل(۴-۱۷) تک کلون‌های تراریخت را که بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کرده‌اند را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱۷ رشد باکتری‌ها تراریخت بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین

۴-۸-۱تایید کلون‌های *E.coli* حاوی پلاسمید نوترکیب با انجام کلونیPCR

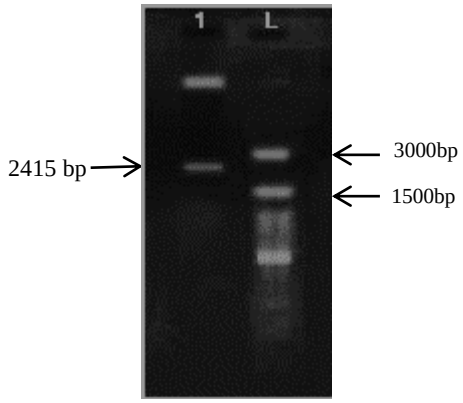
از آنجا که هر کدام از باکتری‌ها در محیط دارای دو آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند تا حدود زیادی می-توان به صحت کلونینگ مطمئن شد. اما برای حصول اطمینان بیشتر آزمون کلونیPCR برای قطعات کلون شده با آغازگرهای اختصاصی و داخلی انجام شد و محصولات آن نیز بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز بررسی گردید(شکل ۴-۱۸).



شکل۴-۱۸ نتایج کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای داخلی *Napin+ Δ15de* ، چاهک‌های شماره ۲،۳،۵ باند تکثیر شده قطعه ژنی *Δ15de* ، چاهک شماره ۶نتایج PCR با پرایمر داخلی کلونی PCR، L: لدر ۳۰۰۰ جفت بازی.

۴-۸-۲ بررسی حضور سازه ژنی از طریق هضم آنزیمی با دو آنزیم *Hind*III و *Sac*I

به منظور تائید بیشتر حضور سازه ژنی *Napin+ Δ15de* را در ناقل *pBI121* هضم آنزیمی با دو آنزیم برشی *Hind*III و *Sac*I انجام شد. همانطور که در شکل(۴-۱۹) نشان داده شده است; قطعه برش‌خورده به طول ۲۴۱۵ جفت باز از ناقل جدا گردید که مربوط به سازه ژنی *Napin+ Δ15de* می‌باشد.

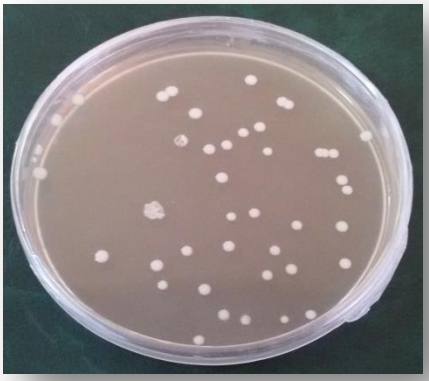


شکل ۴-۱۹ نتایج هضم آنزیمی *Hind*III و *Sac*I حاصل از پلاسمید نوترکیب *pBI121: Napin+ Δ15de*، L: لدر ۳۰۰۰bp

۴-۹ غربال‌گری کلون‌های حاوی پلاسمیدهای نوترکیب *pBI121: Napin+ Δ15de* در آگروباکتریوم

انتقال سازه به باکتری آگروباکتریوم سویه LB4404، به روش انجماد و ذوب صورت گرفت و پس از رشد تک کلون‌های آگروباکتریوم به مدت ۳ روز بر روی محیط جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک ۵۰µg/ml کانامایسین و ۵۰µg/ml ریفامپسین برای تایید بیشتر حضور سازه در تک کلون رشد کرده تعدادی از تک کلون‌ها برای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و داخلی استفاده شد.

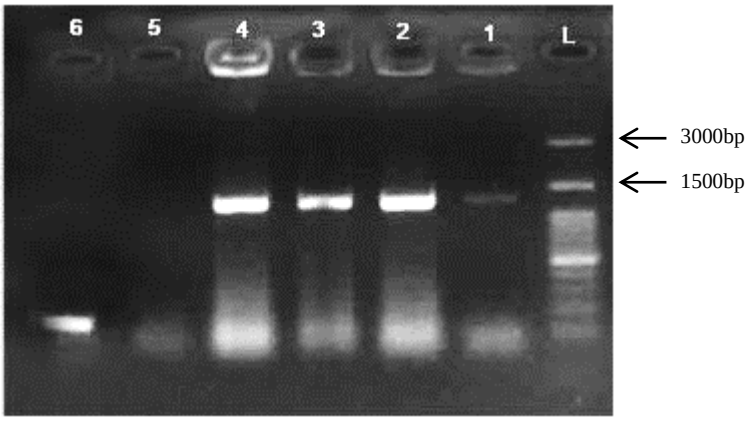
باکتری‌های تراریخت شده بر روی محیط کشت LB حاوی کانامایسین (با توجه به ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در پلاسمید pBI121) رشد داده شدند که شکل(۴-۲۰) تک کلون‌های تراریخت را که بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کرده‌اند را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۲۰ رشد *اگروباکتریوم* حاوی سازه *Napin+ Δ15de* :pBI 121 روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین

۴-۹-۱ تایید کلون‌های آگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر با انجام کلونیPCR

به منظور تایید کلونی‌های نوترکیب باکتری آگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر، برای تعدادی از کلونی‌ها PCR کلونی انجام گرفت. از پرایمرهای اختصاصی ژن *Δ15de* و پرایمرهای داخلی *Napin +* *Δ15de* بدین منظور استفاده گردید و محصولات آن نیز بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز بررسی گردید که به ترتیب قطعاتی به طول ۱۲۴۶ جفت باز و ۱۲۱۰ جفت باز تکثیر گردید (شکل ۴-۲۱).

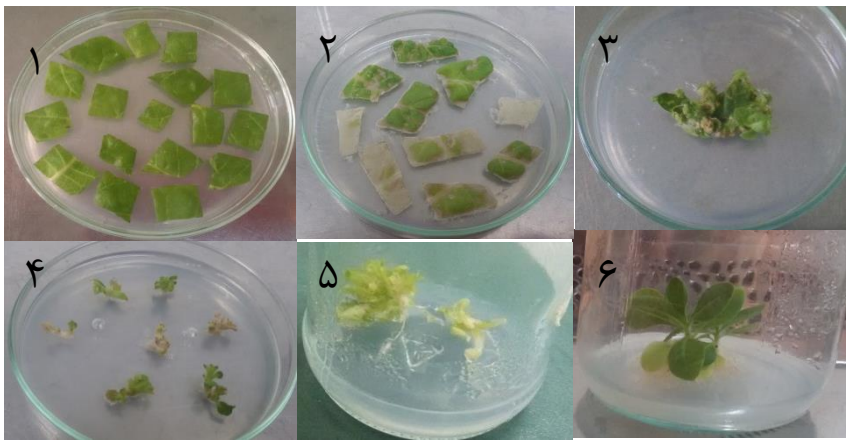


شکل۴-۲۱ نتایج کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای داخلی *Δ15de* و *Napin*، چاهک‌های شماره ۲،۳ باند تکثیر شده قطعه ژنی *Δ15de* ، به ترتیب چاهک ۶ و۵ کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک شماره ۴ نتایج PCR با پرایمر داخلی کلونی L،PCR: لدر ۳۰۰۰ جفت بازی.

۴-۱۰ انتقال آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی *pBI121*: *Napin+ Δ15de* به گیاه توتون

انتقال ژن به گیاه توتون به روش آگروباکتریوم و باززایی مستقیم ریز نمونه‌های گیاهی توسط کشت بافت در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین و سفوتاکسیم صورت گرفت. مدت زمان آلوده سازی ریزنمونه‌ها با محلول تلقیح (حاوی آگروباکتری)، اهمیت ویژه‌ای به منظور دریافت ناقل نوترکیب توسط سلول‌های گیاهی و تراریختی آن‌ها دارد. ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون حاوی آگروباکتریوم قرار گرفتند. سپس قطعات برگی بر روی محیط هم کشتی شامل MS پایه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر هورمون NAA و ۲میلی گرم بر لیتر هورمون BAP منتقل شدند و به مدت دو روز در تاریکی و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این آزمایش از سوسپانسیون سویه‌ی LBA4404 استفاده شد و ریز نمونه به مدت۱۰-۵ دقیقه در ظرف حاوی باکتری قرار گرفتن و هر چند یکبار ظرف تکان داده شد. سپس روی کاغذ صافی قرار گرفتند تا میزان آلودگی بیش از حد

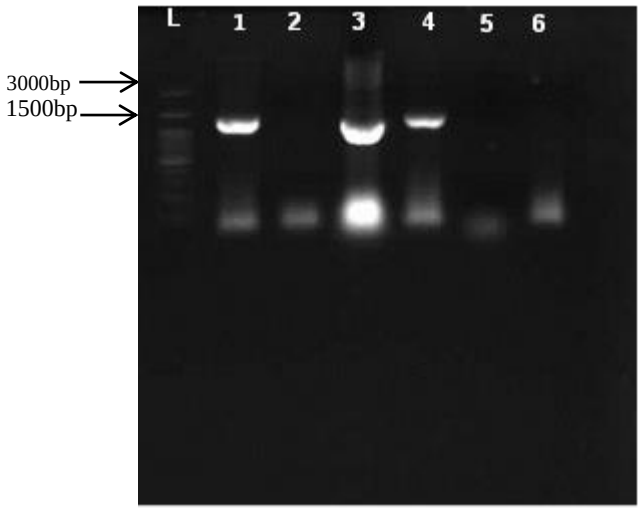
توسط باکتری، باعث از بین رفتن ریزنمونه‌ها نشود. در نهایت ریزنمونه‌ها بـه محـیط MS حـاوی ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA و ۱میلی‌گرم بر لیتر BAP منتقـل شـدند. بـه مـدت ۴۸ سـاعت در محـیط تاریکی دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ایـن زمـان ریـز نمونـه‌هـا بـه محـیط انتخابی حاوی هورمون‌های فوق و کانامایسین به میزان $^{-1}$ mg ۲۵ و $^{-1}$ mgl ۱و $^{-1}$ mgl ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند و به دلیل مشاهده رشد آگروباکتریوم در چند پتری دیـش نمونـه‌هـا میزان آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافـت کـه در ایـن غلظـت آلـودگی باکتریایی مشاهده نشد. هر دو هفته یکبار ریز نمونه‌ها به محیط انتخابی با ترکیبات مشابه با قبل، تنها با این تفاوت که غلظت کانامایسین به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت، منتقل شدند. پس از اینکه ریز نمونه‌ها در اولین محیط انتخابی قرار گرفتند باززایی صورت گرفت. هر گیاهچه از بافت زیری جـدا شد و به محیط جدید انتقال یافت.



شکل۴-۲۲ به ترتیب ازشکل ۱ تا ۶ مراحل برش و آلودگی گیاه توتون با آگروباکتریوم برای انتقال ژن دلتا۱۵ دسچوراز و باززایی گیاه تراریخـت را نشان می‌دهد.

۴-۱۱ تایید DNA و cDNA بدست آمده از توتون تراریخت احتمالی

از برگ گیاه توتون تراریخت احتمالی و شاهد استخراج DNA صورت گرفت و توسط آغازگرهای اختصاصی و داخلی تکثیر صورت گرفت. همانطور که در (شکل۴-۲۳) نشان داده شده است، چاهک شماره ۱ نتایج حاصل از PCR گیاه تراریخته احتمالی با پرایمرهای اختصاصی می‌باشد که قطعه‌ای به طول ۱۲۴۶ bpتکثیر شد و چاهک شماره ۲ گیاه شاهد می‌باشد که فاقد قطعه تکثیر شده است، که نشانگر این است ژن ما به گیاه تراریخته انتقال یافته است. چاهک شماره ۳ نتایج PCR پرایمرهای داخلی برای توالی سازه *Napin + Δ15de* است در نتیجه قطعه‌ای به طول ۱۲۱۰bp تکثیر شده است که بیانگر انتقال درست سازه به گیاه توتون تراریخته می‌باشد. چاهک شماره ۶ واکنش PCR در سطح cDNA می‌باشد، هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد که گویای این مطلب می‌باشد که پروموتر ناپین ویژه دانه بوده و در برگ فعالیتی نداشته و بیان نمی‌شود.



شکل ۴-۲۳ نتایج PCR با پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای داخلی *Δ15de* و *Napin*، چاهک شماره ۱،۴باند تکثیر شده قطعه ژنی *Δ15de* ، چاهک شماره ۲ گیاه شاهد ، شماره ۴ نتایج PCR با پرایمر داخلی کلونی PCR به ترتیب چاهک ۴ و ۵ کنترل مثبت، کنترل منفی و چاهک ۶ نتایج PCR برای cDNA ، L: لدر ۳۰۰۰ جفت بازی.

۴-۱۲ بحث و پیشنهادات

فعالیت آنزیم دلتا۱۵دسچوراز در برخی از گیاهان و میکروارگانیسم‌ها از جمله مخمر *Pichia pastoris* دیده شده است. این آنزیم اسید لینولئیک را به آلفالینولنیک اسید تبدیل می‌کند. جداسازی ژن کد کننده این آنزیم و استفاده از آن در مهندسی مسیر بیوسنتزی اسیدهای چرب می‌تواند حائز اهمیت باشد. در این پروژه، به منظور خالص‌سازی و همسانه‌سازی ژن *Δ15de* از مخمر *Pichia pastoris* سویه GS115 استخراج RNA کل و سنتز cDNA صورت پذیرفت. قطعه کد کننده ژن با استفاده از اغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی موجود در پایگاه NCBI تکثیر گردید. قطعه تکثیر شده به طول تقریبی ۱۲۴۶bp در ناقل *pKS* حاوی سازه ژنی ناپین الحاق گردید و پلاسمید نوترکیب به باکتری E.coli منتقل شد. صحت همسانه‌سازی توسط واکنش PCR و هضم آنزیمی تائید گردید. سازه ژنی پس از انتقال به ناقل دوگانه *pBI121*، به کمک باکتری آگروباکتریوم به گیاه مدل توتون منتقل و بیان آن مورد بررسی قرار گرفت. کمبود اسیدهای چرب یکی از شایع‌ترین مشکلات تغذیه‌ای در جهان است. از آنجا که کاهش اسیدهای چرب بلند زنجیر اشباع نشده (PUFA) مزایای بسیاری در حوضه سلامت و تغذیه نشان داده است به دلیل کاهش منبع ماهی‌های دریایی و کمبود اسیدهای چرب امگا۳ در روغن‌های گیاهی، توسعه یک منبع غذایی اصلی گیاهی غنی، حاوی اسیدهای چرب امگا۳ از طریق اصلاح نباتات سنتی و یا روش‌های بیولوژیکی مولکولی بسیار مفید و مهم می‌باشد. دانه غلات حاوی یک سطح پایینی از آلفالینولنیک اسید است، که با توجه به سطح بیان پایین ژن *Δ15de* ، عمده اسید چرب غیر اشباع موجود در این دانه‌ها لینولئیک اسید می‌باشد. در حال حاضر، منابع اصلی این اسیدهای چرب روغن ماهی و روغن‌های میکروبی هستند. بر طبق گزارشات آنها آلفالینولنیک اسید در دانه به طور عمده توسط دسچورازهای میکروزومی سنتز می‌شود (۸۹). توصیف ویژگی‌های کارکردی ژن‌های اسیدچرب دسچوراز و پروموتر ویژه دانه، شرط لازم برای تغییر مقدار اسید چرب غیر اشباع توسط دستکاری ژنتیکی است. میزان آلفالینولنیک در روغن بسته به هدف مورد نظر می‌تواند کم یا زیاد باشد. مثلا اگر هدف تولید روغن با پایداری زیاد باشد باید میزان آلفالینولنیک

اسید کم باشد. از سوی دیگر، محققان به دنبال دستکاری‌های ژنتیکی برای مهندسی گیاهان به منظور تولید آلفالینولنیک اسید بیشتر می‌باشند. به عنوان مثال(۸) ژن *Δ15de* را از سویا به برنج منتقل کردند و مقدار آلفالینولنیک اسید از ۲/۲٪ به تقریبا ۴۰٪ افزایش یافت. دانه‌های کتان و سویا بیش از غلات و سایر محصولات زراعی حاوی آلفالینولنیک اسید هستند، که نشانگر بیان بالای ژن *Δ15de* در این گیاهان می‌باشد (۹). همچنین ژن *Δ15de* سویا را به همراه ژن گزارشگر GUS به برنج انتقال دادند. محتوای آلفالینولنیک اسید در دانه‌های برنج تا ۳۵٪ افزایش یافت. محتوای آلفالینولنیک اسید در غذای مصرفی حاوی برنج در بزرگسالان باید بیشتر از ۸۶٪ را تشکیل دهد. این دستاورد نشان می‌دهد که امگا۳ موجود در برنج می‌تواند کمک به کاهش مشکلات سلامتی ناشی از کمبود آلفالینولنیک اسید کند (۶۸). مشخصات اسیدهای چرب موجود در روغن‌های نباتی خوراکی نقش مهمی در خصوصیات تغذیه‌ای و کارکردی آن‌ها در صنایع غذایی دارد. ناپایداری روغن‌های حاوی مقادیر بالای اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه منجر به محدودیت استفاده آن‌ها در صنایع غذایی می‌شود. بهبود کارکرد روغن به قیمت کاهش کیفیت روغن و خصوصیات تغذیه‌ای آن، به دلیل ایجاد اسیدهای چرب ترانس در طی هیدروژنه جزیی، تمام می‌شود. به کمک تغییرات هدفدار ژنتیکی می‌توان روغن‌هایی را طراحی کرد که هر دو خصوصیت تغذیه‌ای و پایدار در برابر اکسیداتیو را داشته باشند (۵۰). گزارش شده است که محتوای بالای آلفالینولنیک اسید باعث کاهش پایداری اکسیداتیو روغن می‌گردد، اما با این حال به نظر می‌رسد آلفالینولنیک اسید ذخیره شده در دانه دارای پایداری بالایی است و در دانه سویا بدون تغییر بوده و مقاوم در برابر اکسیداسیون است (۸۸). ALA پیش‌ساز ω3PUFAهای مانند EPA و DHA است (۶۰). موجب تولید EPA تا ۳٪ از کل اسیدهای چرب موجود در برگ آرابیدوپسیس تراریخت شد. (۶۸) نشان داد که امکان تولید PUFAها درکلزای تراریخته، منجر به تجمع EPA ۸٪ و ۲٪ DHA گردید. با توجه به دلایل ذکر شده، انتظار می‌رود در گیاهانی که میزان تولید آلفالینولنیک اسید در سطح بالایی می‌باشد بتوان با بیان همزمان سایر

ژن‌های دسچوراز و الانگاز قادر به تولید اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) در گیاهان شد (۹۵). مهندسی متابولیک دانه‌های روغنی می‌تواند یک منبع جدید و پایدار را برای PUFAها فراهم کند. به تازگی، ژن دسچورازها و الانگازهای میکروبی شناسایی و با موفقیت در دانه‌های روغنی گیاهان بیان شدند. با این حال، هنوز هم سطح تولید PUFAها به وسیله بیان این ژن‌ها در گیاهان ترانس ژنیک بسیار پایین‌تر از میزان تولید همین روغن‌ها در خود میکروارگانیسم‌ها است. اسیدهای چرب غیر اشباع نقش مهمی در حفظ غشای سلولی از طریق تنظیم سنتز کلسترول، انتقال و تنظیم سنتز ایکوزانوئیده ایفا می‌کند (۹۹). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که مصرف کافی آلفالینولنیک اسید در رژیم غذایی بر سلامتی انسان تاثیر گذار است (۳). آلفالینولنیک اسید یک نوع امگا ۳ است که یکی از منابع غذایی اصلی روغن‌های نباتی می‌باشد. میزان آلفالینولنیک اسید در گیاهان مختلف متفاوت است، مثلا در ذرت و برنج ۰-۱٪، در سویا۸٪، در کلزا۱۰٪، در کتان۵۵٪ و در پریلا ۵۸٪ می‌باشد (۵۵،۱۰۱). اطلاعات حاصل از مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی روی بیوسنتز اسید چرب به سرعت در حال افزایش است (۲۱) . مقدار آلفالینولنیک اسید در گیاهان مختلف به میزان زیادی با فعالیت آنزیمی *Δ15de* همبستگی دارد (۹). این واکنش آنزیمی در غشای پلاستیدها و میکروزوم‌ها به ترتیب توسط *Δ15de* پلاستیدی و *Δ15de* میکروزومی انجام می‌شود (۸۷). گیاهان بر اساس تولید آلفالینولنیک اسیدشان به منظور انجام مطالعات دقیق‌تر اساس مولکولی اسید آلفالینولنیک اسید پایین و بالا، به سه گروه Low (تولید ۰ تا ۲۰ درصد آلفالینولنیک اسید)، Medium (تولید ۲۰ تا ۴۰ درصد آلفالینولنیک اسید) و High (تولید ۴۰ تا ۶۰ درصد آلفالینولنیک اسید) تقسیم بندی شدند. مهندسی متابولیک سنتز PUFAها در دانه‌های روغنی مستلزم بیان هماهنگ از ژن‌های متعدد است. اگرچه شناخت ما از امگا۳ دسچورازها هنوز هم ناچیز است، اما تلاش برای دستکاری و ساخت این ژن در قارچ‌ها و گیاهان روغنی هنوز وجود دارد. مخمرهای روغنی قادر به ذخیره روغن تا ۷۰٪ وزن خشک سلولی خود هستند. اما گزارشی از آن به عنوان یک منبع اصلی برای تولید PUFA وجود ندارد. به منظور مهندسی و دستکاری روغن و یا محتویات اسید چرب موجود در دانه گیاهان روغنی بهتر است

از پروموتر ویژه دانه استفاده کرد. به منظور محدود کردن تغییرات روغن و اسیدهای چرب در دانه و برای جلوگیری از تغییرات در لیپیدهای غشایی در بخش‌های دیگر گیاهان است . پروموتر اولین مرحله بیان ژن یعنی اتصال آنزیم RNA پلیمراز به DNA را تنظیم کرده و سرعت ساخته شدن mRNAرا مشخص می کند. بنابراین مقدار پروتئین نوترکیب حاصل به مقدار زیادی به ماهیت پروموتر بستگی دارد. بیان ژن فرایند پیچیده ای است که به طور غیر مستقیم به خود پروموتر مربوط می شود. اما به هر حال بسیاری از توالی‌های اطراف پروموتر که برای القا و مهار بیان ژن مهم هستند. به منظور انتقال ژن‌های مفید به گیاهان، انتخاب پروموتر مناسب و قوی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از بین پروموترهای موجود برای بیان ژن مطلوب در گیاهان زراعی، پروموتر CaMV35S می‌تواند بیان ژن تحت کنترل را در بافتهای مختلف (مانند برگ، شاخه، گل) و در مراحل مختلف رشدی گیاه باعث شود. یکی از مهمترین فاکتورهای محدود کننده مهندسی ژنتیک گیاهی، پایین بودن سطح بیان ژن‌های انتقال داده شده به گیاهان تراریخته است. فعالیت تنظیمی راه‌اندازها در رونویسی به طور وسیعی برای بهبود کارایی سیستم تراریخت گیاهی و رفع این مشکل مورد مطالعه قرار می‌گیرند. مهندسی ژنتیک و انتقال ژن به گیاه نیازمند وجود راه‌اندازهای اختصاصی قوی می‌باشد. در انتقال ژن جدید به گیاه، اگر راه‌انداز مورد استفاده خودی باشد ژن منتقل شده بهتر و بیشتر بیان خواهد شد (۶،۸). پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه مانند ناپین در کلزا بخش عمده‌ای از محتوای پروتئینی دانه را تشکیل می‌دهند. این پروتئین‌ها از لحاظ فیزیولوژی وظیفه تامین مواد مغذی ضروری برای جوانه در حال رشد دانه قبل از ایجاد ظرفیت فتوسنتزی در آن را دارند. ویژگی مشترک این گروه متنوع از پروتئین‌ها محدود شدن سنتز همه آنها در دانه‌های در حال توسعه می‌باشد. پروموتر ناپین بعلاوه همولوگوس‌های 2S پروتئین آرابیدین[1] متعلق به آرابیدوپسیس تالیانا توسط یک خانواده مولتی ژن کدگذاری می‌شوند. تنظیم سنتز فراوان و شدید پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه باعث می‌شود که ژن‌های مربوط به آنها برای مطالعات بر روی مکانیسم‌های اختصاصی بافت و تنظیمات توسعه ژن ایدآل باشند.

[1] - Protein Rabidin 2S

چند عنصر CIS در کنترل بیان ویژه در دانه دخالت دارند. در واقع ژن پروموترهای هر دو پروتئین ذخیره ساز در دو لپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها در بافت‌های خاصی در توتون اصلاح شده بیان شدند. همچنین نشان داد شده است که عوامل رونویسی و حداقل تا حدی توالی اتصال‌شان بین این گروه از گیاهان حفاظت شده است. ناپین یکی از پروتئین‌های ذخیره‌ای مخصوص در رقم کلزا (Brassica napus(rape)) است و اشکال مختلف آن در میان انواع گونه‌های Brassicaceae یافت می‌شود و همچنین در Raphanus sativus (radish) تربچه، (Sinapis alba white mustard) خردل سفید و آرابیدوپسیس تالیانا مشاهده می‌شود. ناپین توسط یک خانواده چند ژنی و چند ایزوفرم ناپین رمزگذاری می‌شود. تاکنون سه توالی از ژن‌های ناپین که شامل، NapA، pGNA و BngNAPI شناسایی شده است. نقش فیزیولوژیکی آنها در جوانه‌های در حال رشد تامین مواد غذایی ضروری را قبل از ایجاد ظرفیت فتوسنتزی در جوانه گیاه است (۲۹،۸۶). در یک تحقیق ژن‌های دلتا۶ دسچوراز گل‌گاوزبان و دلتا۱۵دسچوراز آرابیدوپسیس را در قالب یک سازه تحت کنترل پروموتر ویژه دانه در سویا بیان کردند، سویا دارای لینولئیک بالایی است، میزان تولید SDA در آن افزایش یافت. بیان *Δ15de* به تنهایی قادر به افزایش سطح آلفالینولنیک اسید در دانه حداقل از ۱۰٪ تا حداکثر ۵۳٪ می‌باشد و بیان همزمان دسچورازها منجر به افزایش سطح SDA تا اندازه ۲۵٪ می‌شود، میزان SAD بالا در دانه‌ها باعث افزایش سطح نسبی اسیدهای چرب فسفولیپید شد. همچنین ژن *Δ15de* قارچی یکی از عوامل اصلی در رسیدن به تولید موفقیت آمیز امگا۳ در گیاهان می‌باشد. مسیرطراحی شده با استفاده از هفت ژن بیوسنتز کننده اسید چرب منجر به تجمع DHA تا ۱۵٪ در روغن بذر آرابیدوپسیس تالیانا شد، که به طور کلی میزان سطح تولیدی آن نسبت به سطح تولید آن در فرآورده‌های روغن ماهی ۱۲٪ بیشتر بود (۹۹). به تازگی، یک ارزیابی نظام‌مند وسیعی در مورد نقش سیزده ژن مختلف مربوط به دوازده ترکیب مختلف اسید چرب برای ظرفیت سنتزی ω3PUFA در آرابیدوپسیس تالیانا انجام گرفته است که نشان می‌دهد، *Δ15de* های قارچی نقش حیاتی در هدایت سنتز اسیدهای چرب به سمت تولید اسیدچرب‌های مورد نظر از جمله DHA و EPA بازی می‌کنند.

ترکیبی از فعالیت‌های بالا و سوبسترای بالای تولید شده توسط ژن‌های *Δ15de* قارچی باعث می‌شود که این آنزیم‌ها به خصوص برای استفاده در گونه‌های روغنی مورد توجه قرار گیرند از این نمونه به طور گسترده به عنوان ابزاری جدید برای مطالعه مزایای اسیدهای چرب امگا۳ و مکانیسم عمل مولکولی آن‌ها استفاده می‌شود.

برای ادامه تحقیق مورد نظر پیشنهاد می‌گردد:

۱) انتقال سازه به گیاهان روغنی پر کاربرد مانند سویا و کلزا انجام شود. کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی جهان به شمار می‌رود و از لحاظ تامین روغن خوراکی دارای اهمیت و مورد توجه می‌باشد.

۲) جهت تایید تراریختی آزمون‌های تکمیلی دیگر هم چون بیان این ژن در دانه و بررسی بیان آن درگیاه ترانسفورم شده انجام شود.

۳) ژن *Δ15desaturase* از گونه‌های دیگر نیز همسانه‌سازی و به گیاه منتقل شده و تاثیر بیان آنها در میزان محتوای اسید چرب آلفالینولنیک مورد بررسی مقایسه قرار گیرد.

منابع

فهرست منابع:

۱- الیاس، لیندن، (۱۹۱۴)، ترجمه آبرومند. علی (۱۳۷۸)، **"بیوشیمی مواد غذایی"** تهران: نشر علوم کشاورزی، فصل چهارم، صفحه ۶۵ تا ۷۴

۲- بهامین، ز، (۱۳۸۸)، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، **" جداسازی راه‌انداز اختصاصی بذر از گیاه آفتابگردان (Helianthus annus L)"** ، دانشگاه تبریز، چکیده

۳- فارسی و همکاران، (۲۰۰۹)، **"استفاده از بیوتکنولوژی در اصلاح گوجه فرنگی"**. اولین کنگره ملی فناوری تولید و فرآوری گوجه فرنگی". صفحه ۳ تا ۷

۴- جواران،م. ج، مختار جلالی, قادری, قادر میرزا, شکیب, & علی محمد، (۲۰۰۴)، **"بررسی پروموتور CaMV 35S با استفاده از ژن گزارشگرGUS در کلزای (napus Brassica) تراریخت"**. مجله علوم کشاورزی ایران، صفحه ۳۵

۵-صفری، محمد، (۱۳۸۸)، **"مبانی بیوشیمی کشاورزی"**. تهران: انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۹۹تا ۱۰۵ و ۳۴۹ تا ۳۵۹

۶- میر نظامی ضیابری، سید حسین، (۱۳۷۴)،**" چربی‌ها و روغن‌های خوراکی"**، دانشگاه تهران: انتشارات نشر مشهد، فصل دوم صفحه ۱۵تا۱۰

7- Abbadi A, Domergue F, Bauer J, Napier J, Welti R, Zähringer U, Cirpus P, Heinz E. (2004) **"**Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in ransgenic oilseeds: constraints on their accumulation", **The Plant Cell** 16: 2734-48.

8- Arondel, Vincent, et al. (1992) "Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis", **Science 258.5086**: 1353-1355.

9- Anai, T., Koga, M., Tanaka, H., Kinoshita, T., Rahman, S.M., Takagi, Y.(2003) "Improvement of rice (*Oryza sativa* L.) seed oil quality through introduction of a soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase gene", **Plant Cell Rep**;21:988–992.

10- Anbu, P., D. U. Kim, E. J. Jeh, Y. S. Jeong, and B. K. Hur. (2007) **"**Investigation of the physiological properties and synthesis of PUFAs from Thraustochytrids and its electrophoretic karyotypes*"*, **Biotechnol Bioprocess Eng 12**: 720-729

11- Ando A, et,al, (2009)"Establishment of Agrobacterium tumefaciens-mediate transformation of an oleaginous fungus, Mortierella alpine 1S-4, and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding", **Appl Environ Microbiol. 75(17):5529–5535. doi**:10.1128/AEM.00648-09. [PubMed: 19581481]

12- Alonso, D. L., & Maroto, F. G. (2000) "Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids", **Biotechnology advances**, 18(6), 481-497.

13- Beaudoin, F., Michaelson, L.V., Hey, S.J., Lewis, M.J., Shewry, P.R., Sayanova, O., and Napier, J.A. (2000) " Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97, 6421-6426.

14- Blasbalg, Tanya L., et al. (2011)."Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century", **The American journal of clinical nutrition 93.5**: 950-962

15- Borgeson, C. E., Renobales, M., and Blomquist, G. J. (1990) "Characterization of the delta 12 desaturase in the American cockroach,Periplaneta americana: the nature of the substrate" **Biochim BiophysActa**. 1047(2): 135–140.

16- Banilas, G., Nikiforiadis, A., Makariti, I., Moressis, A. and Hatzopoulos, P. (2007) "Discrete roles of a microsomal linoleate desaturase gene in olive identified by spatiotemporal transcriptional analysis", **Tree Physiol. 27**: 481-490.

17- Brown, T. (2010) **"**Gene cloning and DNA analysis: an introduction", **John Wiley & Sons.**

18-Budziszewski, G. J., Croft, K. P., & Hildebrand, D. F. (1996)" Uses of biotechnology in modifying plant lipids", **Lipids**, *31*(6), 557-569.

19- Chumakov MI, Rozhok NA, Vlikov VA, Tyrnov VS,Volokhina IV. (2006) "Agrobacterium-mediated in planta transformation of maize via pistil filaments", **Russian Journal of Genetic 42**: 893-897

20- Chen, R., Matsui, K., Ogawa, M., Oe, M., Ochiai, M., Kawashima, H., ... & Tanaka, Y. (2006) "Expression of Δ6, Δ5 desaturase and GLELO elongase genes from Mortierella alpina for production of arachidonic acid in soybean [Glycine max (L.) Merrill] seeds", **Plant science**, 170(2), 399-406

21- Collart, M.A. and S. Oliviero (2000) "Current Protocols in Molecular Biology", 1993,Unite. 13.12.1-13.12.5 **.Copyright ©by John Wiley & Sons, Inc**.

22- He Y, Jones HD, Chen S, Chen XM, Wang DW, Li KX, Wang DS, Xia LQ. (2010) " Agrobacterium-mediated transformation of durum wheat (Triticum turgidum L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency", **Journal of Experiment Botanic 61**: 1567-1581.

23-Dijkstra, Albert J., R. J. Hamilton, and Wolf Hamm, (2008) "Fatty Acid Biosynthesis." **Trans Fatty Acids. Oxford**: **Blackwell Pub**. 12.

24- Dai , S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S. and Fauquet, C. (2001)" Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment", **Molecular Breeding**, 7(1), 25-33.

25- Damude, Howard Glenn, and Narendra S. Yadav(2012) "Delta-15 desaturase genes suitable for increasing levels of omega-3 fatty acids." **U.S. Patent Application** 13/611,554, filed September 12

26- Das, Undurti N. (2006) "Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology", **Biotechnology journal 1.4**: 420-439.

27- Domergue, F., Lerchl, J., Zahringer, U., and Heinz, E. (2002) " Cloning and functional characterization of Phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis", **European Journal of Biochemistry 269**, 4105-4113.

28- Domergue, F., Abbadi, A., Ott, C., Zank, T.K., Zahringer, U., and Heinz, E. (2003) "Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast", **Journal of Biological Chemistry 278**, 35115-35126.

29- Ellerström, M., Stålberg, K., Ezcurra, I., & Rask, L.(1996)" Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription", **Plant molecular biology**, 32(6), 1019-1027.

30-E Ckert, H., L, Avallee , B., S Chweiger , B.J., K Inney , A.J., C Ahoon , E.B. and C Lement ,T.(2006) "Co-expression of the borage Δ 6 desaturase and the Arabidops Δ15 desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean", **Planta 224**, 1050-1057.

31-Fatty Acids: "Straight-chain Saturated, Structure, Occurrence and Biosynthesis", Lipid Library – Lipid Chemistry, Biology, **Technology and Analysis**. Web. 30 Apr. 2011. http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/fa_sat/index.htm.

32- Frame, B.,Shou,H., Chikwamba, R., Zhang, Z., Xiang, C., Fonger, T., Pegg, S. E., Li, B., Nettleton, D., Pei, D. and Wang, K. (2002) "Agrobacterium mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system", **Plant Physiol**, 129:13-22

33- Knutzon, D. S., Thompson, G. A., Radke, S. E., Johnson, W. B., Knauf, V. C., & -Kridl, J. C.(1992)"Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene", **Proceedings of the National Academy**

34- Kankaanpaa, P., Sutas, Y., Salminen, S., Lichtenstein, A., Isolauri, E.,(1999) "Dietary fatty acids and allergy", **Ann ciences**, 89(7), 2624-2628

35- Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB.(2004) "Transgenic mice: Fat-1 mice convert n−6 to n−3 fatty acids", **Nature**. 427(6974):504–504.

36- Khadake, R., Khonde, V., Mhaske, V., Ranjekar, P., & Harsulkar, A. (2011) "Functional and bioinformatic characterisation of sequence variants of Fad3 gene from flax", **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91(14), 2689-2696.

37- Knutzon, D. S., Thompson, G. A., Radke, S. E., Johnson, W. B., Knauf, V. C., & Kridl, J. C. (1992) "Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene", **Proceedings of the National Academy of Sciences,** 89(7), 2624-2628

38- Kinney AJ, Cahoon EB, Damude HG, Hitz WD, Kolar CW, Liu ZB (2004)"Production of very long chain polyunsaturated fatty acids in oilseed plants", **International Patent Application WO** 2004/071467A2

39- Kainou, K., Kamisaka, Y., Kimura, K., & Uemura, H. (2006)"Isolation of Δ12 and ω3-fatty acid desaturase genes from the yeast Kluyveromyces lactis and their heterologous expression to produce linoleic and α-linolenic acids in Saccharomyces cerevisiae",**Yeast, 23(8)**, 605-612.

40- Kozak M.(1997) "Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position 4 but is not generally affected by the nucleotides in positions 5 and 6", **EMBO J**; 16:2482-92.

41- Kajikawa, M., Yamato, K. T., Kohzu, Y., Nojiri, M., Sakuradani, E., Shimizu, S., ...&Ohyama, K. (2004)" Isolation and characterization of Δ6-desaturase, an ELO-like enzyme and Δ5-desaturase from the liverwort Marchantiapolymorpha and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast Pichiapastoris", **Plant molecular biology**, 54(3), 335-352.

42- Liu, H. L., Yin, Z. J., Xiao, L., Xu, Y. N., & Qu, L. Q.(2012) "Identification and evaluation of ω-3 fatty acid desaturase genes for hyperfortifying α-linolenic acid in transgenic rice seed", **Journal of experimental botany**, 63(8), 3279-3287

43- Liu, S. J., Wei, Z. M. and Huang, J. Q. (2008) "The effect of co- cultivation and selection parameters on Agrobactrium- mediated transformation of Chinese soybean varieties", **Plant Cell Rep**., 27: 489-498

44- Gelvin, S. B. (2003)" Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the gene-jockeying tool", **Microbiology and molecular biology reviews**, 67(1), 16-37.

45- Gu, Z., Suburu, J., Chen, H., & Chen, Y. Q. (2013)"Mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids in prostate cancer prevention", **BioMed research international**

46- Gurr, M. I., & Harwood, J. L.(1991)"Lipid Biochemistry: An Introduction, Fourth edition", **Chapman and Hall London**.

47- Huang, Y.S., Chaudhary, S., Thurmond, J.M., Bobik, E.G., Yuan, L., Chan, G.M., Kirchner, S.J., Mukerji, P., and Knutzon, D.S.(1999) " Cloning of Delta 12 and Delta 6-desaturases from Mortierella alpina and recombinant production of gamma-linolenic acid in Saccharomyces cerevisiae", **Lipids 34**, 649-659.

48- Iba, Koh, et al. (1993) "A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the fad7 mutant of Arabidopsis thaliana" , **Journal of Biological Chemistry** 268.32: 24099-24105.

49- Macauley-Patrick, Sue, et al. (2005) "Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system", **Yeast 22.4**: 249-270.

50- Marc Jakoby et al. (2002)" bZIP transcription factors in Arabidopsis", **TRENDS in Plant Sci**. Vol.7 No.3.

51- Marotoa, F. G., Jso, A., Cardenasa, G., Rodrguez, R. J., Vilches, F. M., Adamc, A. C., Polainac, J. and Alonso, D. L. (2002) "Cloning and Molecular Characterization of the delta6 desaturase from Two Echium Plant Species: Production of GLA by Hetrologus Expression in Yeast and Tobacoo", **Lipida**, 37: 417-426

52- Millar, A. A., Wrischer, M. and Kunst, L. (1998)" Accumulation of very-long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology", **Plant Cell, 11**: 1889-902

53- Meyer, A., Kirsch, H., Domergue, F., Abbadi, A., Sperling, P., Bauer, J., Cirpus, P., Zank, T.K., Moreau, H., Roscoe, T.J., Zahringer, U., and Heinz E.(2004)" Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis", **Journal of Lipid Research** 45, 1899-1909.

54-Monroig, Ó., Tocher, D. R., & Navarro, J. C. (2013) " Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms", **Marine drugs, 11(10)**, 3998-4018.

55- Murata, J., Takase, H. and Hiratsuka, K. (2002)" Characterization of a novel GT-box binding protein from Arabidopsis", **Plant Biotech. 19(2)**: 103 – 112.

56- Nisha, A. (2009) "Biotechnological Studies for the Production of Arachidonic Acid from Mortierella Alpina", **Doctoral dissertation, University of Mysore**.

57- Nurminen, T., and H. Suomalainen. (1971) "Occurrence of long-chain fatty acids and glycolipids in the cell-envelope fractions of baker's yeast", **Biochem. J 125:** 963-969.

58- Nunber, A. N., Li, Z., Bogue, M. A., Vivekananda, J., Reddy, A. S. and Thomas, T. L. (1994) "Developmental and hormonal regulation of sunflower helianthinin genes: proximal promoter sequences confer regionalized seed expression", **Plant Cell**, 6:473- 486.

59- **New England Journal of Medicine February** 7, 2008; 358: e6.

60- Nishiuchi, T., Kodama, H., Yanagisawa, Sh. and Iba, K. (1999) "Wound-Induced Expression of the FAD7 Gene Is Mediated by Different Regulatory Domains of Its Promoter in Leaves/Stems and Roots", **Plant Physiol**. 121: 1239

61- Orikasa, Y., Nishida, T., Yamada, A., Yu, R., Watanabe, K., Hase, A., and Okuyama, H. (2006) " Recombinant production of docosahexaenoic acid in a polyketide biosynthesis mode in Escherichia coli", **Biotechnology letters**, 28(22), 1841-1847.

62- Oura, T., & Kajiwara, S.(2004) " Saccharomyces kluyveri FAD3 encodes an ω3 fatty acid desaturase", **Microbiology,** 150(6), 1983-1990.

63- Olhaft, P. M., Flagel, L. E., Donovan, C.M. and Somers, D. A. (2003) " Efficent soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary node method", **Planta, 216**: 723-735

64-Pscheidt, Beate, and Anton Glieder. (2008) "Yeast cell factories for fine chemical and API production", **Microb Cell Fact** 7: 25

65-Park, H. (2012) "Modifying the fatty acid profile of soybean oil for nutritional and industrial applications", **Theses, Dissertations, and Student Research in Agronomy and Horticulture**. Paper 71.

66- Parker-Barnes, J.M., Das, T., Bobik, E., Leonard, A.E., Thurmond, J.M., Chaung, L.T., Huang Y.S., and Mukerji, P. (2000) "Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97, 8284-8289.

67- Petrie, James R., Pushkar Shrestha, Xue-Rong Zhou, Maged P. Mansour, Qing Liu, Srinivas Belide, Peter D. Nichols, and Surinder P. Singh. (2012) "Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA." **e49165**.

68- Qi B, Fraser T, Mugford S, Dobson G, Sayanova O, Butler J, Napier J, Stobart K, Lazarus C. (2004) " Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants", **Nature Biotechnology 22**: 739-45.

69- Q IU , X., H ONG , H., D ATLA , N., M ACKENZIE , S.L., T AYLOR , D.C. AND T HOMAS , T.L. (2002)" Expression of borage Δ 6 desaturase in Saccharomyces cerevisiae and oilseed crops", **Canadian Journal of Botany 80**, 42-49.

70- Janice M, Zale S, Agarwal S, Loar CM, Steber. (2009) "Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in Agrobacterium tumefaciens", **Plant Cell Report 28**: 903–913.

71- Jain, S. M. (2001) "Tissue culture-derived variation in crop improvement", **Euphytica**, 118(2), 153-166.

72- J. J. Doyle and J. L. Doyle, (1990)"Isolation of plant DNA from fresh tissue," **Focus, vol. 12, pp**. 13–15

73- Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., & Moghadasian, M. H. (2009) "A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease", **Journal of the American Dietetic Association,** *109*(4), 668-679.

74- Rattray, J. B., Angelo Schibeci, and Denis K. Kidby .(1975) "Lipids of yeasts"**Bacteriological reviews 39.3**: 197

75- Ratledge, Colin. 2004."Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production", **Biochimie 86.11**: 807-815

76- Razzaq A, Hafize I, Mahmood I, Hussain A. (2011) "Development of in planta transformation protocol forwheat", **African Journal of Biotechnology** 740-750

77- Ruiz-López, N., Sayanova, O., Napier, J. A., & Haslam, R. P. (2012) " Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants", **Journal of experimental botany**, 63(7), 2397-2410.

78- Sperling, Petra, and Ernst Heinz. (2003) "Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 1632.1**: 1-15.

79- Sangwallek, J., Kaneko, Y., Tsukamoto, T., Marui, M., Sugiyama, M., Ono, H., and Harashima, S.(2014) " Cloning and functional analysis of HpFAD2 and HpFAD3 genes encoding Δ12-and Δ15-fatty acid desaturases in Hansenula polymorpha", **Gene, 533(1),** 110-118

80- Sakuradani, E., Abe, T., Iguchi, K., & Shimizu, S. (2005)" A novel fungal ω3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing Mortierella alpina 1S-4", **Applied microbiology and biotechnology**, 66(6), 648-654.

81- Supartana P, Shimizu T, Nogawa M, Hidenari S, Nakajima T, Haramoto N, Nozue M, Kojima M. (2006) " Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (Triticum aestivum L.) using Agrobacterium tumefaciens", **Bioscience and Bioengineer** 102 (2): 162-170

82- Supartana P, Shimizu T, Shiori H, Nogawa M, Nozue M, Kojima M. (2005) "Development of simple and efficient in planta transformation method for rice (Oryza sativa L.) Using Agrobacterium tumefaciens", **Bioscience and Bioengineer 100**: 391-397.

83- Sakthivelu, G. (2009)"Genetic modification of soybean (Glycine max (L.) Merrill) with delta-6 desaturase gene for gamma linolenic acid production ", **Doctoral dissertation, University of Mysore**

84-Sohrabi, M., Zebarjadi, A., Najaphy, A., & Kahrizi, D. (2015) " Isolation and sequence analysis of napin seed specific promoter from Iranian Rapeseed (Brassica napus L", **Gene, 563(2),** 160-164.

85- Sayanova, Olga V., and Johnathan A. Napier (2004) "Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants", **Phytochemistry 65.2:** 147-158.

86-Stålberg, K., Ellerström, M., Josefsson, L. G., & Rask, L. (1993) "Deletion analysis of a 2S seed storage protein promoter of Brassica napus in transgenic tobacco", **Plant molecular biology**, 23(4), 671-683.

87-Shanklin, J., and Cahoon, E.B., (1998) "Desaturation and related modifications of fatty acids", **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, 49: 611-641

88- Tocher, D. R., Leaver, M. J., & Hodgson, P. A. (1998) Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. **Progress in lipid research**, 37(2), 73-117.

89- van de Loo, Frank J., and Chris Somerville. (1994) "Plasmid omega-3 fatty acid desaturase cDNA from Ricinus communis", **Plant physiology 105.1**: 443.

90- Vrinten, P., Hu, Z., Munchinsky, M., Rowland, G., Qiu, X. (2005) "Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed", **Plant Physiol.;139**:7987

91- Venegas-Calerón, M., Sayanova, O., & Napier, J. A. (2010) " An alternative to fish oils: metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids", **Progress in lipid research**, 49(2), 108-119.

92- Warude, D., Joshi, K., & Harsulkar, A. (2006)" Polyunsaturated fatty acids: biotechnology", **Critical reviews in biotechnology**, 26(2), 83-93.

93- Wada, H., Gombos, Z. and Murata, N. (1990) " Enhancement of chilling tolerance of a cyanobaterium by genetic manipulation of fatty acid desaturase", **Nature, 347**: 200-3

94- Wriessnegger, T., Gübitz, G., Leitner, E., Ingolic, E., Cregg, J., Bernard, J., & Daum, G. (2007) "Lipid composition of peroxisomes from the yeast Pichia pastoris grown on different carbon sources", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids,** 1771(4), 455-461.

95- Wu, Q., Liu, H. and Zheng, G. (2009). *Unsaturated fatty acid: Metabolism, synthesis and gene regulation. Africanj*. Biotech. 8(9): 1782-1785

96- Wu, G.H., Truksa, M., Datla, N., Vrinten, P., Bauer, J., Zank, T., Cirpus, P., Heinz, E., and Qiu ,X.(2005) " Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants", **Nature Biotechnology 23**, 1013-1017.

97- Yazawa, H., Iwahashi, H., Kamisaka, Y., Kimura, K., Aki, T., Ono, K., and Uemura, H. (2007) " Heterologous production of dihomo-gamma-linolenic acid in Saccharomyces cerevisiae", **Applied and Environmental Microbiology** 73, 6965-6971.

98- Yu, Ai-Qun, et al.(2012) "Knockout of fatty acid desaturase genes in Pichiapastoris GS115 and its effect on the fatty acid biosynthesis and physiological consequences", **Archives of microbiology 194.12**: 1023-1032.

99- Zhang, X., Li, M., Wei, D., & Xing, L. (2008) "Identification and characterization of a novel yeast ω3-fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from Pichia pastoris" , **Yeast,** 25(1), 21-27.

100- Zhang, S., Sakuradani, E., Ito, K., & Shimizu, S. (2007) " Identification of a novel bifunctional Δ12/Δ15 fatty acid desaturase from a basidiomycete", **Coprinus cinereus TD# 822-2. FEBS letters**, 581(2), 315-319

101- Zinati, Z., Zamansani, F., KayvanJoo, A. H., Ebrahimi, M., Ebrahimi, M., Ebrahimie, E., & Dehcheshmeh, M. M. (2014) "New layers in understanding and predicting α-linolenic acid content in plants using amino acid characteristics of omega-3 fatty acid desaturase", **Computers in biology and medicine,** *54*, 14-23.

102- Zhang, M., Barg, R., Yin, M., Gueta, D. Y., Leikin, F. A., Salts, Y., Shabtai, S. and Ben, H. G. (2005) " Modulated fatty acid desaturation via over expression of two distinct x-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants", **The Plant J.** 44:361-3

Abstract

Alpha-linolenic acid, as an important polyunsaturated fatty acid belongs to omega3 family, which is not produced in humans and, therefore, as a part of the diet should be taken into consideration to protect human health. Since The main source for this group of fatty acids is fish and because of environmental pollution, production of oilseed plants with the ability to produce high omega 3 fatty acids could provide a cheap and valuable source. The aim of this study is to clone *Δ15desaturase* gene in order to transfer oil plants to enhance the content of alpha-linolenic acid as a precursor to long-chain polyunsaturated fatty acids . In order to purification and amplification *Delta 15 desaturase* gene was reproduced, the total RNA was extracted and cDNA was synthesized from yeast *pichia pastoris* cells . *Delta 15 desaturase* gene amplification by PCR reaction with specific primers and the vector *pTZ57R / T* was cloned in E. coli bacteria. After selection of grown colonies on the selective medium containing the antibiotic ampicillin and coloning PCR, positive clones were selected. Digested by enzymes *Xba*I and *Sac*I cutting and sequencing of cloned fragment, the existance of gene in cloning vector was confirmed. This gene construct was cloned in the recombinant vector containing *pKS* special *Napin* seed promoter was cloned. Enzymatic digestion with enzymes *Hind*III and *Sac*I was performed the desired gene vector and the vector pBI121 was separated and then was cloned in *E. coli* bacteria. The grown Clones in selective medium containing the antibiotic kanamycin was selected and structural integrity *delta-15 desaturase* gene and promoter *Napin* was confirmed by performing colony PCR. The recombinant plasmid was transferred to *Agrobacterium*. After the contraction with Agrobacterium, for transformation of tobacco plants, the growning of explants of tobacco plants on selective medium containing different concentrations of kanamycin and cefotaxime approved their transformation. PCR with primers different transgenic tobacco plants also was confirmed in DNA level.

Keywordes: Delta15 desaturase, Alpha-linolenic acid, Pichia pastoris، *Napin* promoter, Fatty acid, PUFA

University Of Shahrood

Faculty of Agriculture Bastam

Cloning of Δ15 Desaturase gene to enhance the production of Poly unsaturated fatty acid (ALA;C18:3)

Marzieh Hasani

Supervisor:

Dr. Shahrokh Garanjik

Advisor:

Dr.Hamid Reza samamdluiy

September 2015