چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

تغییرکدون اسیدامینه گلایسین۹۶ به آلانین درژنEPSPS باکتریایی واتصال آن به ترادف نشانه کلروپلاستي روبیسکو به منظورتولیدکلزا متحمل به علف کش گلایفوسیت

کتایون حمصي* (۱)و(۲)، علی هاتف سلمانیان ** (۲)، علي دلجو(۱)، افسون افشاری(۲)
۱- دانشکده کشاورزی دانشگاه بو علي سینا همدان
۲- پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتیک و زیست فناوری (NIGEB) تهران- ایران

چکیده:
علف کش گلایفوسیت با اثر بر روی آنزیم EPSPS که یکي از آنزیمهای مهم چرخه شیکیمات است،مانع ساخته شدن اسیدهای آمینه حلقوی ودر نهایت مرگ گیاه مي گردد.به منظور ایجاد مقاومت در این آنزیم،پس از تکثیر و جدا سازی ژن آن از منبع پروکاریوتي،با استفاده از روش ایجاد جهش نقطه ای(SDM) در یک اسیدآمینه این ژن تغییر ایجاد شد. به منظور هدایت محصول این ژن به محل عملکرد آن در گیاه (کلروپلاست) از توانایي ترادف نشانه(signal peptide) کلروپلاستي که از زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو جدا شده، استفاده گردید. ترادف نشانه به روش PCR از ژنوم گیاه کلزا جداو با استفاده از روشهای مولکولي به ژن EPSPS جهش یافته متصل شد.در نهایت این ساختار جدید در پلاسمید pTZ57R/T کلون و به جهت تایید جهش ایجاد شده واتصال مناسب (ترادف نشانه به ژن EPSPS موتانت) تعیین توالي شد. نتیجه تعیین توالي با استفاده از نرم افزار BLAST و جستجو در بانکهای ژني مورد تایید قرار گرفت.
کلمات کلیدی:کلزا، گلایفوسیت، ژن جهش یافته EPSPS ، ترادف نشانه

مقدمه:

با توجه به اهمیت گیاهان روغني، امروزه بهینه سازی کاشت،داشت وبرداشت این گیاهان مورد توجه قرار گرفته است. در این میان گیاه کلزا به دلایل مختلف زراعي وتغذیه ای ازجایگاه ویژه ای برخوردار است. در بهینه سازی مرحله داشت کلزا، مبارزه با علفهای هرز از مراحل اساسي محسوب مي شود. ازمیان روش های مرسوم و موثردر کنترل علفهای هرز می توان به استفاده از علف کشهای قوی با طیف وسیع عمل که در خاک به سرعت تجزیه می شوند، نظیر گلایفوسیت با نام تجاری رانداپ اشاره کرد. این علف کش قادر است در رقابت با فسفو انول پیروات و با اتصال به آنزیم انول پیرویل شیکیمات ۵-فسفو سنتتاز (EPSPS)، آن را غیر فعال سازد. این آنزیم از آنزیمها ی مسیر شیکیمات بوده و در ساخت اسیدهای آمینه آروماتیک در کلروپلاست دخالت دارد. مسئله محدود کننده در استفاده از این علف کش غیر اختصاصي بودن آن در مهار آنزیم EPSPS است، که علاوه بر علفهای هرز گیاهان زراعي را نیز از بین خواهد برد. لذا به منظور بکار گیری این علف کش باید گیاهان زراعي را تا حدود قابل قبولي به گلایفوسیت متحمل ساخت. در این پروژه به منظور ایجاد مقاومت در آنزیم از روش ایجاد جهش نقطه ای در ژن EPSPS باکتریایی (۱۳۰۰bp) استفاده شده است. سپس ساختار جهش یافته ژن EPSPS با استفاده ازروش های مولکولی به ترادف نشانه کلروپلاستي روبیسکو (۱۷۰bp) متصل شد. این اتصال موجب می گردد که آنزیم مورد نظر پس از ساخته شدن در سیتوپلاسم گیاه با کارایی مناسب به اندامک کلروپلاست که محل عملکرد آنزیم است، منتقل گردد.

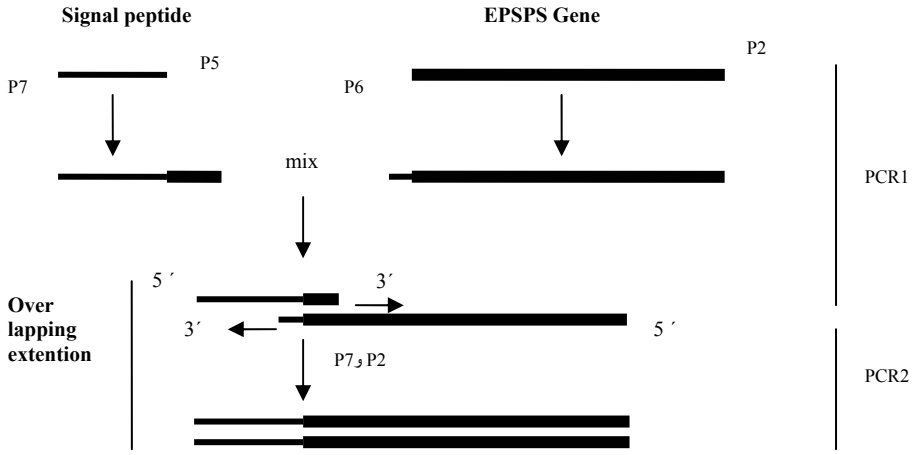
مواد و روشها:

آنزیم های محدود کننده داخلی، پلیمرازهایی با خاصیت اصلاح اشتباه، dNTP و سایر مواد مورد نیاز از شرکت Roche تهیه گردید

تکثیر قطعات ژني و اتصال آنها : جهت تکثیر ژن EPSPS باکتریایی از پرایمرهای P1 و P2 استفاده شد. به منظور ایجاد جهش و تبدیل Gly96 به Ala در ژن EPSPS از روش جهش نقطه ای هدفمند (SDM) و از پرایمرهای P3 و P4 و تکنیک PCR استفاده شد.(نوکلئوتیدهای تغییر یافته در شکل ۵ مشخص شده است) برای اتصال ترادف نشانه کلروپلاستي به ژن جهش یافته از روش توسعه نقاط هم پوشان استفاده گردید. این نقاط مشترک با بهره گیری از روش PCR و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای انتهای ´۳ ترادف نشانه (P5) و انتهای ´۵ ژن EPSPS (P6) بوجود آمد. در نهایت تکثیر ساختار مورد نظر از طریق پرایمرهای P7 وp2 صورت گرفت. به منظور سهولت در مراحل کلونینگ در ابتدای برخي پرایمرها جایگاه برش *Bam*H1 تعبیه شد.این جایگاهها به صورتunder line درتوالي زیر مشخص شده است. ترادف پرایمرها به شرح زیر است :

P1: 5´ CG<u>G GAT CC</u>A TGG AAT CCC TGA CGT TAC AA 3´
P2: 5´ CG<u>G GAT CC</u>T CAG GCT GCC TGG CTA ATC 3´
P3: 5' TCC TCG GTA ACG CCG <u>C</u> AA CGG 3'
P4: 5´ TGC CGT T<u>G</u>C GGC GTT ACC GAG GA 3'
P5: 5´ CGT CAG GGA TTC CAT CGA GTT AAC TCT TCC T 3´
P6: 5´ AGG AAG AGT TAA CTC GAT GGA ATC CCT GAC G 3
P7: 5´ GAA <u>GGA TCC</u> ATG GCT TAC TCT ATG CT 3´

خلاصه روش مورد استفاده به منظور اتصال ترادف نشانه به ژن جهش یافته EPSPS در شکل زیربه نمایش در آمده است.



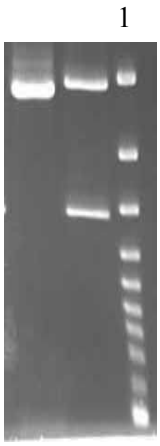
ساختار تکثیر یافته، در پلاسمیدpTZ57R/T کلون گردید. تائید کلونینگ در ناقل به کمک هضم آنزیمی و PCR با پرایمرهای اختصاصي (P2وp7) صورت گرفت. به منظور تائید جهش ایجاد شده و اطمینان از محل اتصال قطعات، کلونهای مورد نظر تعیین ترادف گردید.

نتایج و بحث :

تکثیر ژن EPSPS در حضور ۳ میلی مولار Mg^{2+} انجام شد.(شکل ارائه نشده است) به منظور ایجاد جهش، تکثیر قطعات حد واسط 300bp (پرایمرهای p1وp4) و 1000bp (پرایمرهای p2 وp3) در غلظت ۲/۵ میلی مولار Mg^{2+} و دمای اتصال C ۶۳° درجه صورت گرفت. اتصال ژن EPSPS جهش یافته به ترادف نشانه با تکثیر قطعات DNA مورد نظر و ایجاد نقاط هم پوشان انجام گرفت. بهترین نتیجه در ایجاد نقاط هم پوشان در هر دو قطعه در غلظت ۲ میلی مولارMg^{2+} ودمای اتصال دو مرحله ای C ۴۵° وC° ۵۸ بدست آمد.(تصویر۱) اتصال این قطعات به روش توسعه نقاط هم پوشان صورت گرفت. نتیجه این PCR ایجاد قطعه ای به طول تقریبیbp ۱۵۰۰ است.(شکل۲) تایید کلونینگ با روش هضم آنزیمي(*Bam*H1) وPCR انجام گرفت. (شکل ۴ و۳) تعیین ترادف کلونهای مورد نظر با استفاده از روش ختم زنجیره (sanger) انجام شد. نتایج تعیین ترادف با نرم افزارBLAST بررسي شد و در بانک ژن مورد تایید قرار گرفت.

تصویر۱: ایجاد انتهاهای هم پوشان در EPSPS و ترادف نشانه با PCR
۱-مارکر100 bp
۲-ترادف نشانه(170 bp)
۳-ژنEPSPS جهش یافته

تصویر۲: اتصال ژن EPSPS به ترادف نشانه از طریق PCR
۱-مارکر100 bp ۲-ساختار حاصل از اتصال EPSPS جهش یافته به ترادف نشانه(1500 bp) از طریق PCR



تصویر۳ : نتیجه هضم آنزیمي با BamH1 به منظور تایید کلونیگ
۱-پلاسمید بدون قطعه
۲- پلاسمید و قطعه (1500 bp)
۳- مارکر 100 bp

تصویر۴ : نتیجه PCR انجام شده به به منظور تایید کلونیگ ۱- مارکر 100 bp
۲-PCR کلني مشکوک با پرایمرهای اختصاصي (1500bp)

ATGGCTTACTCTATGCTCTCCTCTGCCACCGTGGTTAGCTCACCGGCTCAAGCGGCC
ATGGTTGCTCCATTCACAGGCTTGAAGTCATCCGCTGCATTCCCAGTCACTCGCAAG
ACCGACACTGACATTACTTCCATGGCAAGCAATGGAGGAAGAGTTAACTCGatggaatc
cctgacgttacaacccatcgctcgtgtcgatggcactattaatctgcccggttccaagaccgtttctaaccgcgctttattgctggcggcatta
gcacacggcaaaacagtattaaccaatctgctggatagcgatgacgtgcgccatatgctgaatgcattaacagcgttaggggtaagctata
cgctttcagccgatcgtacgcgttgcgaaattatcggtaacggcggtccattacacgcagaaggtgccctggagttgttcctcggtaacgcc
gcaacggcaatgcgtccgctggcggcagctctttgtctgggtagcaatgatattgtgctgaccggtgagccgcgtatgaaagaacgcccg
attggtcatctggtggatgcgctgcgcctgggcggggcgaagatcacttacctggaacaagaaaattatccgccgttgcgtttacagggcg
gctttactggcggcaacgttgacgttgatggctccgtttccagccaattcctcaccgcactgttaatgactgcgcctcttgcgccggaagata
cggtgattcgtattaaaggcgatctggtttctaaaccttatatcgacatcacactcaatctgatgaagacgtttggtgttgaaattgaaaatcag
cactatcaacaatttgtcgtaaaaggcgggcagtcttatcagtctccgggtacttatttggtcgaaggcgatgcatcttcggcttcttactttctg
gcagcagcagcaatcaaaggcggcactgtaaaagtgaccggtattggacgtaacagtatgcagggtgatattcgctttgctgatgtgctgg
aaaaaatgggcgcgaccatttgctggggcgatgattatatttcctgcacgcgtggtgaactgaacgctattgatatggatatgaaccatattc
ctgatgcggcgatgaccattgccacggcggcgttatttgcaaaaggcaccaccaggctgcgcaatatctataactggcgtgttaaagagac
cgatcgcctgtttgcgatggcaacagaactgcgtaaagtcggcgcggaagtggaagaggggcacgattacattcgtatcactcctccgga
aaaactgaactttgccgagatcgcgacatacaatgatcaccggatggcgatgtgtttctcgctggtggcgttgtcagatacaccagtgacga
ttcttgatcccaaatgcacggccaaaacatttccggattatttcgagcagctggcgcggattagccaggcagcctga

تصویر ۵- توالي حاصل ازاتصال ترادف نشانه(حروف بزرگ) به ژن EPSPS جهش یافته (حروف کوچک) – نقطه جهش به صورت under line نشان داده شده است (GAA CAA) , (گلایسین۹۶ به آلانین)

منابع:

1-Alibhai M. F. and Stallings W. C.; “Closing Down on Glyphosate Inhibition with a New Structure for Drug Discovery” ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001); 98: 2944- 2946***

2-Baerson S. R., Rodriguez D. J., Tran M., Feng Y., Biest N. A. and Dill G. M.; “Glyphosate Resistance Goosegrass. Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5- Enol Pyruvyl Shikimate 3-Phosphate Synthase.” ***Plant Phisiology (2002); 129: 1265- 1275***

3-Chen L. Pradhan S. Evans T. C.; “Herbicide Resistance from Devided EPSPS Protein: The Split Synechocystis DnaE Intein as Invitro Affinity Domain.” ***Gene (2001); 263: 39- 48***