دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی

بررسی انتقال ژن پروانسولین انسانی به گیاه خیار

به روش اگروباکتریوم

تحقیق و تدوین

کامه ابوکاظمی امیری

استاد راهنما

دکتر مختار جلالی‌جواران

استاد مشاور

دکتر حمید دهقانی

تیر ۱۳۹۰

تقدیم به

پدر بزرگوارم

که شانه‌هایش تکیه‌گاه زندگی‌ام بوده است،

مادر مهربانم

که وجودش برایم همه عشق است،

و برادر عزیزم

که همواره پشتیبانی‌ام کرده است.

تشکر و قدردانی

سپاس از خداوند خورشید و ماه　　روان را به‌دانش نماینده راه

نداند جز او آشکارا و راز　　به‌دانش مرا آز و او بی نیاز

در اجرای این طرح تحقیقاتی و به ثمررسیدن آن، استادان، راهنمایان، مشاوران، و دوستان دست‌اندرکار فراوانی یاری‌ام داده‌اند که نام بردن از همهٔ آن‌ها و کمک‌هاشان شاید مقدورم نباشد. اما، از آن میان، بزرگواران و عزیزانی بوده‌اند که سهم تأثیرگذاری در پیشبرد این کار پژوهشی داشته‌اند. نام و یاد اینان البته از یاد رفتنی نیست، و لازم است که در اینجا از راهنمایی‌ها و مساعدت‌های بی‌دریغ‌شان به‌ویژه قدردانی و سپاسگزاری کنم.

استاد بزرگوار جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران به عنوان استاد راهنما در این کار نقش بسیار ارزنده‌ای داشته‌اند که صمیمانه از ایشان سپاسگزارم. از جناب آقای دکتر حمید دهقانی به عنوان استاد مشاور کمال تشکر را دارم. سرکار خانم مهندس مرجان آزموده، کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی، در عمل و در طول اجرای این طرح زحمات فراوانی متقبل شده است که صمیمانه سپاسگزارشان هستم. از جناب آقایان مهندس ایری و مهندس یادگاری نیز، به‌عنوان کارشناسان آزمایشگاه اصلاح نباتات و کشت بافت، تشکر می‌کنم. جناب آقای دکتر مهدی محب‌الدینی تهیه‌کنندهٔ باکتری همسانه‌سازی شدهٔ این طرح بوده است که باید قدردان این کار پژوهشی پیشگامانه و سپاسگزارشان باشم. از جناب آقای مهندس مهدوی، که در جهت بررسی‌های آماری نتایج به‌دست‌آمده مساعدت کرده‌اند، صمیمانه تشکر می‌کنم. از جناب آقایان دکتر معینی، دکتر کریم‌زاده، دکتر میرفخرایی، استادان گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، هم به‌خاطر رهنمودهاشان سپاسگزری می‌کنم. از دوستان عزیزم خانم‌ها سیدعباسی، صبوری، سلطان‌محمدی، مرتضایی‌فر، یقطین، ویشلقی، کاشانی، و شیخی و آقایان خسروی، رزمی، و تعویضی که در طول مدت انجام این‌کار با من همفکری و همکاری داشته‌اند نیز تشکر می‌کنم.

در پایان از تک‌تک اعضای خانواده‌ام هم که در همهٔ امور تحصیل و زندگی پشتیبانی‌ام کرده‌اند، سپاسگزارم.

کامه ابوکاظمی

تیر ۹۰

چکیده

امروزه مردم زیادی در جهان، به نوعی از دیابت مرتبط با انسولین رنج می‌برند. همچنین تخمین زده شده است که در آینده‌ای نزدیک تعداد افراد مبتلا به دیابت دو برابر خواهد شد. همراه با افزایش تعداد بیماران دیابتی در دنیا، افزایش تقاضا برای هورمون انسولین (با رشد ۳ الی ۴ % در سال) قابل پیش بینی است. روبرو شدن با این میزان تقاضا، توسعهٔ روش‌های ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیت تولید بالا را برای آینده ضروری می‌نماید. با توجه به پتانسیل بالای گیاهان برای تولید زیست‌داروها، با بهره‌گیری از زراعت مولکولی(Mulecular farming) تولید و عرضهٔ انسولین با استفاده از گیاهان نیز می‌تواند چشم‌انداز نوید بخشی باشد.به همین منظور، در این تحقیق انتقال ژن پروانسولین انسانی به گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت.

مهمترین مرحله در انتقال ژن بدست آوردن باززایی موفق از گیاه است، بنابراین نهادینه شدن کشت بافت خیار اولین گام در انتقال ژن پروانسولین به آن است. با توجه به نبود هیچ گزارشی در مورد باززایی و کشت بافت ارقام خیار ایرانی، در این تحقیق ابتدا کشت‌بافت و باززایی مستقیم خیار واریتهٔ اصفهان، با آزمون ۴۰ تیمار هورمونی مختلف، نهادینه شد. به منظور انتقال ژن، از باکتری اگروباکتریوم، سویهٔ LBA4404 دارای ناقل pCAMBIA1304 حاوی ژن پروانسولین تحت کنترل پیشبرندهٔ CaMV 35S، استفاده شد. جهت انتقال ژن، ریزنمونه‌های کوتیلدونی با اگروباکتریوم تلقیح شده و پس از هم‌کشتی، به محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. جوانه‌های باززایی شده در محیط کشت انتخابی، جهت افزایش رشد ساقه و ریشه‌زایی به محیط کشت دیگری منتقل شدند. گیاهچه‌های تراریخت حاصل، پس از سازگاری با محیط، به گلدان و گلخانه منتقل شدند. گیاهان خیار تراریخت پس از طی مراحل رشدی، ابتدا تولید گل و سپس میوه نمودند. بذرگیری از میوه‌های گیاهان تراریخت به منظور آنالیز آن‌ها در نسل دوم، صورت پذیرفت.

آنالیز گیاهان تراریخت خیار در سه سطح DNA، RNA و پروتئین انجام شد. آنالیز در سطح DNA به روش آزمون PCR، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد و بدین‌ترتیب، با تکثیر ژن پروانسولین، تراریختی گیاهان تأیید شد. به منظور بررسی بیان ژن پروانسولین منتقل شده به خیار، با استخراج RNA از گیاهان تراریخت و شاهد و استفاده از آزمون RT-PCR ، بیان ژن پروانسولین در سطح RNA به تأیید رسید. به منظور آنالیز بیان پروتئین، از سه روش SDS-PAGE ، دات بلات و لومینسانس‌الکتروشیمیایی (Electrochemiluminescence) استفاده شد. در نتایج حاصل از بررسی در سطح پروتئین، حضور و بیان پروتئین نوترکیب پروانسولین در گیاه تراریخت نیز تأیید شد.

کلید واژه‌ها: زراعت مولکولی، انتقال ژن، پروانسولین انسانی، خیار ، پروتئین نوترکیب، دیابت

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول‌ها ..... ط
فهرست شکل‌ها ..... ی

فصل ۱- مقدمه ۱
۱-۱- مقدمه ۲

فصل ۲- بررسی منابع ۵
۲-۱- انواع سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب ۶
۲-۲- گیاهان به عنوان کارخانه‌های زیستی ۷
۲-۲-۱- پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در گیاهان ۸
۲-۳- روش‌های انتقال ژن به گیاهان ۱۱
۲-۴- انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم ۱۱
۲-۴-۱- اساس مولکولی انتقال ژن به گیاهان با اگروباکتریوم ۱۳
۲-۴-۲- مزایا و معایب انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم به گیاهان ۱۵
۲-۵- انسولین ۱۶
۲-۵-۱- تولید و ترشح انسولین ۱۶
۲-۶- دیابت و انواع آن ۱۷
۲-۶-۱- اهمیت بیماری دیابت ۱۹
۲-۷- بررسی بیان ژن انسولین در گیاهان ۱۹
۲-۸- گیاه خیار به عنوان بیوراکتور ۲۱
۲-۸-۱- مشخصات گیاه‌شناسی خیار ۲۲
۲-۹- تاریخچه کشت بافت و تراریختی در خیار ۲۴

فصل ۳- مواد و روش ۳۰
۳-۱- مواد شیمیایی ۳۱
۳-۲- مواد گیاهی ۳۱
۳-۳- باکتری ۳۱
۳-۴- توالی ژن و پروتئین پروانسولین ۳۳
۳-۵- آغازگرها ۳۳
۳-۶- محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها ۳۴
۳-۶-۱- محیط کشت باکتریایی LB ۳۴
۳-۶-۲- تهیهٔ ذخیره مادری از باکتری ۳۴

۳-۶-۳- محیط کشت گیاهی MS ۳۵
۳-۷- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۳۷
۳-۷-۱- نحوه تهیهٔ محلول ذخیره‌ای هورمون‌ها(اکسین و سایتوکنین) ۳۷
۳-۸- آنتی بیوتیک‌های مورد نیاز ۳۷
۳-۹- ضدعفونی و کشت بذرها ۳۸
۳-۱۰- آماده‌سازی سوسپانسیون اگروباکتریوم حاوی ژن پروانسولین جهت انتقال ژن ۳۹
۳-۱۱- کشت بافت گیاه خیار ۳۹
۳-۱۲- تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی خیار با اگروباکتریوم حاوی ژن هدف ۴۱
۳-۱۳- ایجاد باززایی در سلول‌های تراریخت و تولید گیاه کامل ۴۱
۳-۱۴- آنالیز گیاهان تراریخت ۴۲
۳-۱۴-۱- آنالیز در سطح DNA ۴۲
۳-۱۴-۱-۱-استخراج DNAی ژنومی گیاه ۴۲
۳-۱۴-۱-۲-اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNAی استخراجی ۴۴
۳-۱۴-۱-۳-تکثیر قطعه DNA با استفاده از روش PCR ۴۵
۳-۱۴-۱-۴-الکتروفورز ژل آگارز ۴۷
۳-۱۴-۱-۵-تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۴۸
۳-۱۴-۲- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح RNA ۴۸
۳-۱۴-۲-۱-استخراج RNA ۴۸
۳-۱۴-۲-۲-بررسی کیفیت RNAی استخراج شده ۴۹
۳-۱۴-۲-۳-ساخت cDNA و آنالیز RT-PCR ۴۹
۳-۱۴-۲-۴-واکنش RT-PCR برای تکثیر محصول cDNA ۵۰
۳-۱۴-۳- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح پروتئین ۵۰
۳-۱۴-۳-۱-استخراج پروتئین ۵۰
۳-۱۴-۳-۲-تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۵۱
۳-۱۴-۳-۳-الکتروفورز ژل SDS ۵۱
۳-۱۴-۳-۴-آزمون دات بلات ۵۲
۳-۱۴-۳-۵-الکتروکمی‌لومینسانس Electrochemiluminescence (ECL) ۵۲

فصل ۴- نتایج و بحث ۵۴

۴-۱- کشت بافت خیار ۵۵
۴-۱-۱- القای ساقه‌زایی ۵۵
۴-۱-۲- القای ریشه‌زایی ۵۸
۴-۲- تعیین آستانهٔ تحمل رقم خیار مورد بررسی به آنتی‌بیوتیک ۵۹

۴-۳- تأیید حضور ژن پروانسولین در اگروباکتریوم ۶۰
۴-۴- انتقال ژن پروانسولین به گیاه خیار ۶۰
۴-۴-۱- تلقیح ریزنمونه‌های کوتیلدونی با اگروباکتریوم حاوی ژن پروانسولین ۶۰
۴-۴-۲- انتقال ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت انتخابی ۶۱
۴-۴-۳- مراحل افزایش رشد و ریشه‌زایی جوانه‌های باززایی شده خیار در محیط کشت انتخابی ۶۲
۴-۵- نگهداری گیاهان تراریخته ۶۳
۴-۵-۱- انتقال گیاهچه‌ها به خاک ۶۳
۴-۵-۲- گلدهی و میوه‌دهی گیاهان تراریخته ۶۴
۴-۵-۳- بذرگیری از میوه‌های تراریخته ۶۵
۴-۶- آنالیز گیاهان تراریخته ۶۶
۴-۶-۱- آنالیز گیاهان تراریخته در سطح DNA ۶۶
۴-۶-۱-۱- استخراج DNA ژنومی و بررسی کیفیت و کمیت آن ۶۶
۴-۶-۱-۲- آنالیز گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از روش PCR ۶۷
۴-۶-۲- آنالیز گیاهان تراریخته در سطح RNA ۶۸
۴-۶-۳- آنالیز گیاهان تراریخته در سطح پروتئین ۶۹
۴-۶-۳-۱- الکتروفورز ژل SDS ۶۹
۴-۶-۳-۲- آزمون دات بلات ۷۰
۴-۶-۳-۳- الکتروکمی‌لومینسانس (Electrochemiluminescence) ۷۱
۴-۷- بحث ۷۲
فهرست منابع ۸۱

فهرست جدول‌ها

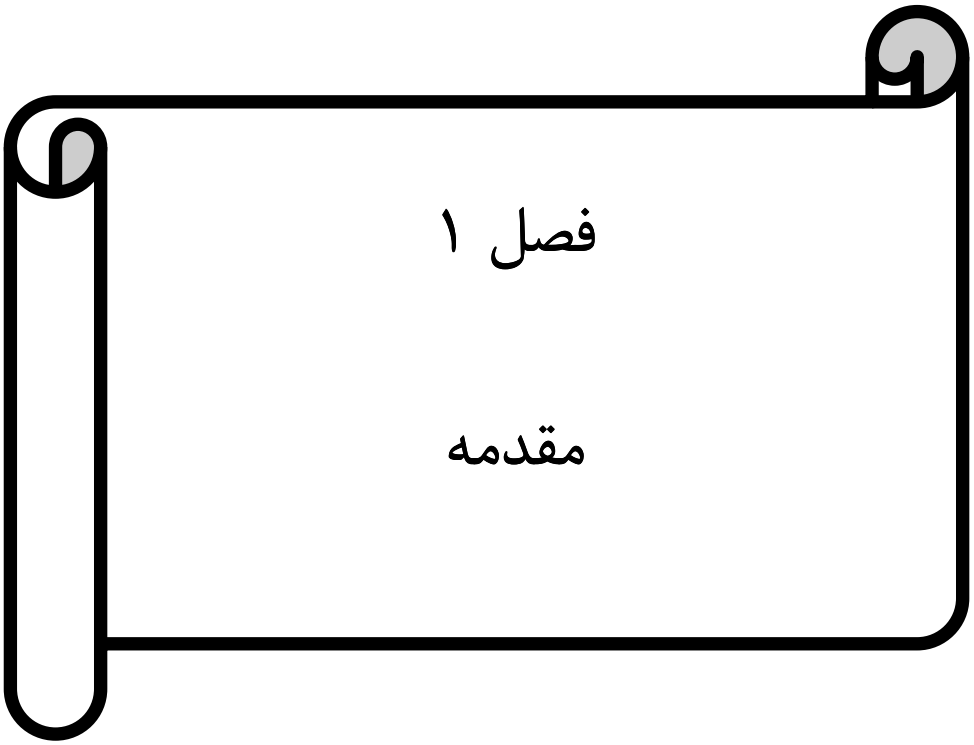
عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱) مقایسهٔ سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب ۷
جدول ۲-۲) پروتئین‌های نوترکیب دارویی تولید شده در گیاهان ۹
جدول ۲-۳) برخی از گزارشات تراریختی در خیار به روش انتقال ژن با اگروباکتریوم ۲۵
جدول ۲-۴) برخی از گزارشات تراریختی در خیار به روش انتقال ژن مستقیم ۲۸
جدول ۳-۱) مواد تشکیل دهنده محیط کشت MS و غلظت آن‌ها ۳۶
جدول ۳-۲) غلظت آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در محیط‌های کشت ۳۸
جدول ۳-۳) تیمارهای هورمونی مورد استفاده در محیط کشت MS (mg/L) به منظور بهینه کردن سیستم باززایی مستقیم از خیار ۴۰
جدول ۳-۴) مقدار مواد لازم برای تهیه ۱۰۰ ml بافر استخراج DNA در روش CTAB ۴۳
جدول ۳-۵) مواد مورد نیاز جهت آزمون PCR ۴۶
جدول ۳-۶) شرایط PCR برای ژن پروانسولین ۴۶
جدول ۳-۷) مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر TBE(۱۰ X) ۴۷
جدول ۳-۸) مواد لازم جهت تهیه بافر بردفورد ۵۱
جدول ۴-۱) تجزیه واریانس درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدونی، واریته خیار اصفهان ۵۷
جدول ۴-۲) مقایسه میانگین اثر متقابل BAP و NAA بر میزان باززایی خیار ۵۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱) نقشه ناقل Ti و بخش‌های مختلف آن ۱۳
شکل ۲-۲) نحوه آلوده شدن سلول گیاهی توسط اگروباکتریوم ۱۳
شکل ۲-۳) مراحل تکامل پروتئین انسولین ۱۷
شکل ۳-۱) نقشهٔ ناقل بیانی pCAMBIA1304 ..... ۳۲
شکل ۳-۲) سازهٔ همسانه‌سازی شدهٔ ژن پروانسولین در ناقل بیانی گیاهیpCAMBIA1304 ..... ۳۲
شکل ۴-۱) کشت و جوانه‌زنی بذرهای خیار. ۵۵
شکل ۴-۲) باززایی مستقیم از ریزنمونه کوتیلدونی خیار ۵۶
شکل ۴-۳) افزایش رشد و ریشه‌زایی گیاهچه خیار در محیط کشت MS ۵۸
شکل ۴-۴) تعیین آستانهٔ تحمل ریزنمونه‌های خیار به آنتی‌بیوتیک ۵۹
شکل ۴-۵) تأیید حضور ژن پروانسولین در اگروباکتریوم با استفاده از آزمون Colony PCR ۶۰
شکل ۴-۶) جوانه‌های خیار مقاوم به آنتی بیوتیک باززایی شده بر سطح محیط انتخابی ۶۱
شکل ۴-۷) ریشه‌زایی و افزایش رشد گیاهچه‌های تراریخت ۶۲
شکل ۴-۸) انتقال گیاهان تراریختهٔ خیار به گلدان ۶۳
شکل ۴-۹) گل‌دهی و میوه‌دهی گیاهان تراریخته ۶۴
شکل ۴-۱۰) میوه‌های گیاهان خیار تراریخته و بذرگیری از آن‌ها. ۶۵
شکل ۴-۱۱) الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان خیار ۶۶
شکل ۴-۱۲) آنالیز DNA ژنومی گیاهان باززایی شده بر سطح محیط انتخابی با استفاده از تکنیک PCR ۶۷
شکل ۴-۱۳) بررسی بیان ژن هدف در گیاهچه‌های تراریخته با استفاده از تکنیک RT-PCR ۶۸
شکل ۴-۱۴) ژل SDS پروتئین‌های استخراجی از گیاهان تراریخته در مقایسه با شاهد ۶۹
شکل ۴-۱۵) بررسی بیان پروتئین پروانسولین در گیاهچه‌های تراریخته با استفاده از تکنیک دات بلات ۷۰
شکل ۴-۱۶) دستگاه الکتروکمی‌لومینسانس(Electrochemiluminescence) برای اندازه‌گیری میزان پروتئین نوترکیب پروانسولین ۷۱


فصل ۱
مقدمه

۱-۱- مقدمه

تولید زیست‌داروها و پروتئین‌های مهم کاربردی، از طریق گیاهان را اصطلاحاً زراعت مولکولی[1] می‌گویند. زراعت مولکولی دارای توانایی بالایی در تولید انبوه و ارزان پروتئین‌های نوترکیب ازجمله آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، فاکتورهای رشد و آنزیم‌ها است. بیوراکتورهای گیاهی می‌توانند تا ۱۰ کیلوگرم آنتی‌بادی در هکتار تولید کنند. در مقایسه با سایر سیستم‌های تولیدی (مانند دام، فرمانتور و غیره)، قیمت تمام شده آنتی‌بادی در گیاهان حدود ۰/۱ و حتی گاهی تا ۰/۰۰۱ کاهش می‌یابد(Schillberg *et al*., 2002).

نزدیک به ۰/۷ درصد جمعیت جهان به نوعی از دیابت مرتبط با انسولین رنج می‌برند (Winter *et al.,* 2001). به طور معمول در کشورهای صنعتی بیماری دیابت بعد از بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان سومین عامل مرگ و میر محسوب می‌شود (Barfoed, 1987). تخمین زده شده است تا ۲۵ سال آینده تعداد افراد مبتلا به دیابت دو برابر شده و به تقریباً ۳۰۰ میلیون نفر خواهد رسید (Kjeldsen *et al.,* 2001). تا به حال درمان با استفاده از انسولین تنها روش مؤثر برای درمان دیابت نوع اول بوده است. درمان این بیماران نیازمند تنظیم دقیق میزان قند خون با تزریق متناوب انسولین است. سخت بودن تزریق به بدن توسط خود شخص بیمار، منجر به عدم رضایتمندی بیماران از روش تزریق به خود شده است. برای حل این مشکل، روش‌های مختلفی برای راحتی مصرف انسولین ایجاد شده‌اند که شامل مصرف ریوی انسولین و مصرف از طریق بینی می‌باشد (Goldberg and Gomez-Orellana, 2003; Cefalu, 2004). اگر چه ممکن است این روش‌ها مقبول واقع شوند ولی برای جبران کاهش جذب از طریق این روش‌ها به میزان دز بیشتری (۵ الی ۲۰ برابر) نیاز است. همراه با افزایش تعداد بیماران دیابتی در دنیا، معرفی روش‌های مکمل

[1] - Molecular farming

جدید برای مصرف این هورمون و همچنین افزایش تقاضا برای هورمون انسولین (میزان رشد ۳ الی ۴ % در سال) قابل پیش بینی است. روبرو شدن با این میزان تقاضا، توسعهٔ روش‌های ارزان، مقرون به صرفه و با ظرفیت تولید بالا را برای آینده ضروری می‌نماید (Nykiforuk *et al.,* 2006).

انسولین نوترکیب انسانی در موجودات مختلفی مثل، باکتری (Chan *et al.,* 1981)، مخمر (Thim *et al.,*1986)، قارچ (Wang *et al*., 2001)، کشت‌های سلولی پستانداران (Yanagita *et al.,* 1992)، و گیاهان تراریخت (Arakawa *et al.,* 1998) بیان شده است. با این حال، تولید تجاری این داروی بسیار ضروری به باکتری(*Escherichia coli*) و مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) محدود شده است (Thim *et al.,* 1986). سیستم‌های گیاهی تولید پروتئین‌های نوترکیب، پتانسیلی ایمن، اقتصادی و با ظرفیتی بالا را برای تولید بسیاری از زیست داروها عرضه می‌کنند (Deckers *et al.,* 1999).

تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی از طریق ریزسازواره‌ها چندین محدودیت از جمله نیاز به تجهیزات زیاد، هزینه‌های بالای تولید و احتمال آلودگی بالا با پاتوژن‌ها را دارد. با تکنولوژی پیشرفته‌ی DNAی نوترکیب، گیاهان تراریخته به عنوان سیستم جذابی برای بیان و تولید مقادیر زیادی از آنزیم‌های صنعتی و پروتئین‌های دارویی مطرح می‌شوند (Goddijn and Pen 1995 ; Daniell *et al*., 2001).

در مجموع، گیاهان کارخانه‌های زیستی جذابی برای تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب، در مقایسه با سیستم‌های دیگر تولید هستند. امروزه بسیاری از پروتئین‌ها و پپتیدهای دارویی در گیاهان تراریخت تولید می‌شوند (Erickson *et al.,* 2002; Larrick *et al.,* 2002). گیاه خیار می‌تواند یکی از این کارخانه‌های زیستی تولید پروتئین‌های نوترکیب باشد. خیار گیاهی گلدار، یکساله جالیزی، از رده دولپه‌ای‌ها، خانواده کدوئیان (*Cucurbithacae*) و جنس *Cucurbita* با نام علمی (*Cucumis sativus*) است.

بر اساس یک گزارش میوهٔ خیار (*Cucumis sativus*) به طور مشخص سطح زیر منحنی تحمل به گلوکز و پیک قند خون را در خرگوش‌های سالم کاهش داده است (Chattopadhyay *et al.*, 1991). همچنین این گیاه یکی از میوه‌های پیشنهادی برای دیابت جهت کاهش میزان قند خون است که علاوه بر آن دارای طعمی خوب بوده و سطح زیر کشت وسیعی نیز دارد (Zhao *et al.*, 2009). با توجه به ویژگی‌های مطلوب خیار، انتقال ژن به آن صورت پذیرفته و در یک تحقیق انتقال ژن Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) به گیاه خیار با هدف تولید گیاه دارویی جهت درمان دیابت، صورت گرفته است (Zhao *et al.*, 2009).

با توجه به افزایش ۳ تا ۴ درصدی بیماران دیابتی در هر سال و افزایش تقاضا برای انسولین و نیاز به تولید انبوه و ارزان این داروی حیاتی، در قالب این پروژه درصد آن برآمدیم تا امکان‌سنجی تولید این هورمون با ارزش را در میوهٔ گیاه خیار بررسی نماییم.

فصل ۲

بررسی منابع

۲-۱- انواع سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب

امروزه روش‌های زیادی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب بکار برده می‌شوند. ولی تمامی سیستم‌های موجود نقایصی دارند که محدود کنندهٔ توسعهٔ این سیستم‌ها هستند. کشت‌های باکتریایی به طور نمونه مقادیر بالایی از محصولات نوترکیب را در زمانی کوتاه و قیمت پایین تولید می‌کنند. اما سیستم‌های پروکاریوتی فاقد تغییرات پس از ترجمه مثل گلیکوزیلاسیون و ساختارهای دی‌سولفید هستند و پروتئین‌های نوترکیب ممکن است غیرفعال باشند. تولید پروتئین‌های نوترکیب بوسیلهٔ سلول‌های حشرات و پستانداران می‌تواند بر این مشکلات غلبه کنند اما هر دو روش گرانقیمت هستند و علاوه بر آن تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی بوسیلهٔ کشت سلول‌های پستانداران به‌علت وجود عوامل بیماری‌زای مشترک با انسان، ریسک آلودگی پروتئین نوترکیب با پاتوژن‌ها را بالا می‌برد (Schillberg and Fischer, 2004). در مقابل گیاهان می‌توانند به آسانی، با هزینه‌ی کم و در مقادیر زیاد در زیرساخت‌های کشاورزی موجود، رشد کنند. پروتئین‌های تولید شده پیچش صحیحی دارند به طوری که، سیستم تغییرات پس از ترجمه در گیاهان و جانوران بسیار مشابه است. علاوه بر این با توجه به نبود پاتوژن‌های مشترک حیوانی و انسانی با گیاهان، می‌توان تولید پروتئین‌های نوترکیب سالمی را انتظار داشت (Fischer and Emans, 2000).

جدول ۲-۱) مقایسهٔ سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب (Ma *et al.*, 2003).

سیستم	گیاهان تراریخت	کشت سلولی گیاهان	حیوانات تراریخت	کشت سلولی پستانداران	مخمر	باکتری
هزینه تولید	بسیار کم	متوسط	زیاد	زیاد	متوسط	کم
دورهٔ تولید	طولانی	متوسط	بسیار طولانی	طولانی	متوسط	کوتاه
مقیاس پذیری	بسیار زیاد	متوسط	کم	بسیار کم	زیاد	زیاد
کیفیت تولید	بالا	بالا	بسیار بالا	بسیار بالا	متوسط	پایین
گلیکوزیلاسیون	کمترین تفاوت	کمترین تفاوت	صحیح	صحیح	ناصحیح	ندارد
خطرات احتمالی	کم	کم	ویروس، پریون و عوامل سرطان‌زا	ویروس، پریون و عوامل سرطان‌زا	کم	سموم داخلی
هزینهٔ ذخیره‌سازی	بسیار کم	متوسط	بالا	بالا	متوسط	متوسط

۲-۲- گیاهان به عنوان کارخانه‌های زیستی(زراعت مولکولی)

تولید زیست‌داروها و پروتئین‌های مهم کاربردی، از طریق گیاهان را اصطلاحاً زراعت مولکولی[1] می‌گویند. گیاهان همواره بطور سنتی به عنوان منبع دارویی مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند، اما استفاده از گیاهان تراریخت در زراعت مولکولی به منزلهٔ انقلاب علمی و ظهور منبع جدید دارویی (شامل: پروتئین‌های پلاسما، آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، واکسن‌ها و آنتی بادی‌های نوترکیب) است. تا چندی پیش، گسترهٔ استفاده از این نوع مواد دارویی به‌دلیل

[1] - Molecular farming

دشواری تولید آن‌ها درخارج از بدن جانوران یا سلول‌های جانوری محدود بود. بکارگیری بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی در دهۀ ۱۹۹۰ نشان داد که بسیاری از این داروها می‌توانند در گیاهان تولید شوند(Schillberg *et al*., 2002). سلول‌های گیاهی قابلیت بیان پروتئین‌های نوترکیب و پیچیدۀ بسیاری را دارند همچنین تولید انبوه و ایمن پروتئین‌های نوترکیب به دلیل عاری بودن گیاهان از عوامل بیماریزای انسانی، امکان‌پذیر است(Schillberg *et al*., 2002). پروتئین‌های خارجی بیان شده در گیاهان، ساختار اصلی خود را حفظ می‌کنند، بنابراین می‌توان از گیاهان تراریخت برای تولید پروتئین‌های با ارزش دارویی استفاده کرد (Daniell, 2003).

مهمترین مزیت کاربرد گیاهان تراریخته، سالم بودن فرآورده‌های حاصل از آن‌ها است. گیاهان تراریخته نمی‌توانند میزبان پاتوژن‌های انسانی باشند. از اینرو فرآورده‌های آلوده به پاتوژن‌های انسانی مانند ویروس هپاتیت، ویروس HIV ، عوامل سرطان‌زا و سموم باکتریایی تولید نمی‌کنند. همچنین سیستم‌های گیاهی به‌دلیل دارا بودن امکانات سلول‌های یوکاریوتی برای پردازش پس از ترجمه پروتئین‌ها، بر خلاف سلول‌های پروکاریوتی قادر به تا کردن[۱] و سرهم کردن[۲] درست آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌های چند زنجیره‌ای هستند (Ferrante and Simpson, 2001).

۲-۲-۱- پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در گیاهان

امروزه، پروتئین‌هایی مانند هموگلوبین آلفا و بتای انسانی[۳] (Dieryck *et al.,*1997) در گیاه توتون، آلفا-۱- آنتی‌تریپسین انسانی (AAT) در کلروپلاست توتون (Nadai *et al*., 2008) و داروی

[1] - Folding
[2] - Assembling
[3] – Human α and β hemog lobin

گران‌قیمت گلوکوسروبروزیداز[1] (Cramer *et al.* 1996) در گیاه توتون، تولید شده‌اند. همچنین گزارشی از تولید Cyanovirin-N دارویی بر علیه ویروس HIV[2] در ریشه‌های موئین گیاه توتون ارائه شده است (Sexton et al., 2005).

جدول ۲-۲) پروتئین‌های نوترکیب دارویی تولید شده در گیاهان (Twyman *et al*., 2005).

پروتئین‌های دارویی نوترکیب

پروتئین	گیاه میزبان	منبع
α interferon, human	برنج شلغم	Zhu *et al*., 1994
Synthetic elastin	کلروپلاست توتون	Guda *et al*., 2000
Protein C, human	توتون	Cramer *et al* ., 1996
Lysozyme	دانه برنج کشت سلولی برنج	Humphrey *et al*., 2004 Yang *et al*., 2003
Pancreatic lipase	توتون ذرت	Gruber *et al*., 2001
Secreted alkaline Phosphatase, human	توتون	Komarnytsky *et al*., 2000
Glucocerebrosidase	توتون	Cramer *et al.,* 1996
Growth hormone, human	توتون، کالوس آفتابگردان کلروپلاست توتون بذر توتون	Barta *et al.,* 1986 Staub *et al*., 2000 Leite *et a*l., 2000
Erythropoietin, human	کشت سوسپانسیون توتون	Matsumoto *et al*., 1995
Hirudin, leech	کلزا	Parmenter *et al.,* 1995
Lactoferrin	غده سیب زمینی برنج توتون توتون (وکتور ویروسی)	Chong *et al*., 2000 Suzuki *et al.,* 2003 Chong *et al*., 2000 Li *et al* ., 2004
Aprotinin	ذرت	Zhong *et al*., 1999
Haemogolobin (α and β globin), human	بذر توتون	Dieryck *et al.,* 1997
Glutamic acid decarboxylase	توتون	Avesani *et al*., 2003
Enkephalins, human	آرابیدوپسیس بذر کلزا	Vandekerckhove *et al*., 1989
Collagen, human	توتون	Ruggiero *et al*., 2000

[1]- glucocerebrosidase
[2] -Human Immuno deficiency Virus

Serum albumin, human	برگ توتون و سیب زمینی کلروپلاست توتون غده سیب زمینی	Sijmons *et al*., 1990 Fernandez- san millan *et al*., 2003 Farran *et al*., 2002

آنتی‌بادی‌های نوترکیب

آنتی بادی	گیاه میزبان	منبع
Colon Cancer Antigene(IgG)	برگ توتون(وکتور ویروسی)	Larrick et al., 2001
Ferritin(scFv)	برگ توتون	Semenyuk et al., 2002
Interleukin-6(scFv)	ریشه توتون	Ehsani et al., 2003
Human IgG	یونجه	Khoudi et al., 1999
HIV antibodies in blood	برگ توتون، دانه جو، غده سیب زمینی	Schunmann et al., 2002
Herpes simplex virus 2	سویا	Kapusta et al., 1999
Hepatitis B virus surface antigen	برگ توتون	Ramirez et al., 2003
Streptococcal surface antigen(sIgA)	برگ توتون	Ma et al., 1995

واکسن‌های نوترکیب

آنتی ژن	گیاه میزبان	منبع
Bovin Herpes Virus	برگ توتون	Perez Filgueira *et al*., 2003
Rabies Virus	برگ سیب زمینی	Castanon *et al*., 1999
Murin Hepatit Virus	توتون	Koo *et al*., 1999
Enterotoxigenic E. coli heat labile toxin, B Subunit	بذر ذرت غده سیب زمینی میوه و برگ گوجه فرنگی	Lamphear *et al*., 2002 Tacket *et al*., 1998 Walmsley *et al.,* 2003
Hepatit C Virus	برگ های توتون	Natilla *et al*., 2004
Human papillomavirus(type 11)	برگ توتون غده سیب زمینی	Warzecha *et al*., 2003
Human papillomavirus(type 16)	توتون (با وکتور ویروسی)	Franconi *et al*.,2002
Human rhinovirus(type 14)	لوبیا چشم بلبلی	Porta *et al*., 1994
Cholera toxin B subunit	غده سیب زمینی برگ توتون کلروپلاست توتون برگ و میوه گوجه فرنگی	Arakawa *et al*., 1998 Kang *et al*., 2004 Daniell *et al*., 2001 Jani *et al*., 2002
Rotavirus NSP4 protein	غده سیب زمینی	Arakawa *et al*., 2001
Mannheimia haemolytica A1 leukotoxin	گندم	Lee *et al*., 2001
Tetanus toxin, fragment C	کلروپلاست توتون	Tregoning *et al*., 2003
SARS fragment S1	گوجه فرنگی توتون	Pogrebnyak *et al*., 2005