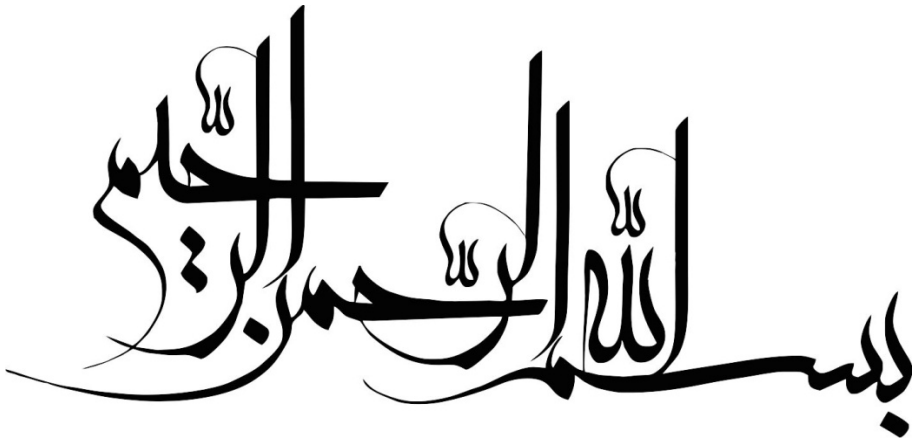
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی

رساله برای دریافت درجه دکتری تخصصی (Ph.D)

رشته اصلاح نباتات گرایش اصلاح نباتات

همسانه سازی و امکان سنجی انتقال ژن اینترفرون گاما به کلروپلاست توتون و بررسی گیاهان تراریخت

نگارنده

شهلا رزمی

استاد راهنما

مختار جلالی جواران

استادان مشاور

عبدالرضا باقری

حسین هنری

اسفند ۱۳۹۱

دانشگاه تربیت مدرس

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم شهلا رزمی رساله ۱۸ واحدی خود را با عنوان:**همسانه سازی و امکان سنجی انتقال ژن اینترفرون گاما به کلروپلاست توتون و بررسی گیاهان تراریخت** در تاریخ ۹۱/۱۲/ ۵ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	مختار جلالی جواران	دانشیار	
۲- استاد مشاور اول	عبدالرضا باقری	استاد	
۳- استاد مشاور دوم	حسین هنری	دانشیار	
۴- استاد ناظر	محمد رضا زمانی	استاد	
۵- استاد ناظر	علی عبادی	استاد	
۶- استاد ناظر	محمد صادق ثابت	استادیار	
۷- استاد ناظر	سجاد رشیدی منفرد	استادیار	
۸- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	محمد صادق ثابت	استادیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **شهلا رزمی** دانشجوی رشته **اصلاح نباتات** ورودی سال تحصیلی **۸۷-۸۶** مقطع **دکتری** دانشکده **کشاورزی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **اصلاح نباتات** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به **راهنمایی دکتر مختار جلالی جواران** ، مشاوره **دکتر عبدالرضا باقری و دکتر حسین هنری** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ :در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ :دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **شهلا رزمی** دانشجوی رشته **اصلاح نباتات** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: شهلا رزمی

تاریخ و امضا

تقدیم به:

پویندگان راه علم و دانش:

آنان که خود را وقف اعتلای افق های فکر بشر کرده اند

تشکر و قدردانی

پروردگارا، جلال و شکوهت برتر و بزرگیت بالاتر از همهٔ بزرگی هاست. رحمت و درود تو بر برگزیدگانت و تمام کسانی که در جهت شناخت آیات تو قدم بر می دارند. پس از ستایش یزدان، حق شاگردی را بجا آورده و از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران که در به ثمر رسیدن این رساله از هیچگونه مساعدت و همفکری مضایقه نفرمودند، صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

همچنین از جناب آقای دکتر عبدالرضا باقری و جناب آقای دکتر حسین هنری که مشاوره این رساله را بر عهده گرفته و همواره از راهنمایی های ارزنده ایشان استفاده کردم، تشکر و قدردانی می نمایم.

از آقای دکتر قاسم کریم زاده، آقای دکتر حمید دهقانی، آقای دکتر احمد معینی، آقای دکتر سیدرضا قلی میرفخرایی، آقای دکتر سجاد رشیدی منفرد و آقای دکتر محمد صادق ثابت اساتید گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس، کارشناسان آزمایشگاه خانم مهندس آزموده و آقای مهندس ایری صمیمانه تشکر می کنم.

همچنین از خانواده عزیزم بویژه پدر و مادرم که دعای خیرشان همواره راه گشای من در تمام مشکلات بوده است و همسرم به خاطر تشویق ها و حمایت های بی دریغش ، نهایت تشکر و قدرانی را دارم.

همچنین از دوستانم در گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی خانم ها و آقایان محب الدینی، یاربخت، سلیمانی زاده، عبدلی نسب، یقطین، مرتضایی فر، شیخی، صبوری، کاظمی، تعویذی، لطیف، امیری، فابریکی، سلطان پور و ...کمال تشکر و قدردانی را دارم.

سپاس و درود بیکران نثار همه عزیزانی که در این راه باری بر دوش کشیده اند و مرا مرهون منت و محبت خویش کرده اند.

شهلا رزمی- زمستان ۱۳۹۱

چکیده

کشاورزی مولکولی شاخه جدیدی از بیوتکنولوژی گیاهی است که در آن گیاهان برای تولید پروتئین های نوترکیب دارویی و صنعتی در حجم زیاد مهندسی می شوند. یکی از تکنیک های مورد استفاده در کشاورزی مولکولی انتقال ژن به کلروپلاست به جای هسته در گیاهان می باشد که موجب شده است عملکرد و کیفیت پروتئین های تولید شده در گیاهان بهبود یابد و سیستم گیاهی را به یک سیستم تولید کم هزینه و کم خطر تبدیل نماید. استفاده از این تکنیک به دلیل مزایای زیاد احتمالا جوابگوی نیاز روز افزون به پروتئین های دارویی به ویژه در کشور های در حال توسعه خواهد بود.

در این تحقیق، هدف امکان سنجی بیان ژن اینترفرون گامای انسانی در کلروپلاست گیاه توتون بود. اینترفرون گاما یکی از پروتئین های دارویی با ارزش در علم پزشکی است و در درمان سرطان ها و بیماری های عفونی کاربرد دارد. به منظور تولید این پروتئین در کلروپلاست، ژن اینترفرون گاما در ناقل کلروپلاستی pKCZ ، بین پیشبرنده Prrn و نشانگر گزینشی *aadA* همسانه سازی شد. سپس برگهای توتون در شرایط استریل به وسیله ناقل حاوی اینترفرون گاما متصل به ذرات طلای ۰/۶ میکرونی با استفاده از سیستم بایولیستیک بمباران شدند. ریز نمونه های بمباران شده به محیط کشت RMOP حاوی ۵۰۰mg/l اسپکتینومایسین منتقل شدند. بعد از گذشت چند هفته گیاهچه های مقاوم به آنتی بیوتیک باززا شدند. این گیاهچه ها بعد از اینکه به حد کافی رشد کردند در محیط کشت MS حاوی اسپکتینومایسین ریشه دار شدند. گیاهان مقاوم در سطح DNA، RNA و پروتئین آنالیز شدند. نتایج آنالیزها در سطح DNA نشان داد که ژن اینترفرون گاما در جایگاه صحیح در ژنوم کلروپلاست درج شده است سپس هموپلاسمی در گیاهان تراریخت کلروپلاستی با آزمون سادرن بلات تایید شد. رونویسی ژن اینترفرون گاما به وسیله تکنیک RT-PCR اثبات شد و بررسی بیان اینترفرون گاما به وسیله SDS-PAGE، آزمون دات بلات و وسترن بلات، تولید پروتئین اینترفرون گاما را در کلروپلاست نشان داد. نهایتا اندازه گیری میزان پروتئین اینترفرون گاما در برگ گیاهان تراریخت با آزمون ELISA نشان داد که میزان بیان آن تقریبا ۰/۲٪ از کل پروتئین محلول در برگ می باشد که در مقایسه با تراریخت های هسته ای بسیار بالاتر می باشد اما به دلیل نیمه عمر پایین و تجزیه آن در کلروپلاست، میزان آن کمتر از تراریخت های کلروپلاستی می باشد.

کلمات کلیدی: کشاورزی مولکولی، پروتئین های نوترکیب، تراریختی کلروپلاستی، اینترفرون گاما، سیستم بایولیستیک، هموپلاسمی

فهرست مطالب

فهرست مطالب ..... أ

فهرست شکل ها ..... ح

فهرست جدول ها ..... د

فصل اول مقدمه و کلیات ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- روش های بیان پروتئین در گیاهان ۳

۱-۳- مزایای انتقال ژن به کلروپلاست ۴

۱-۴- انتقال ژن به کلروپلاست ۵

۱-۴-۱- کلروپلاست و ژنوم آن ۵

۱-۴-۲- بیان ژن در کلروپلاست ۸

۱-۴- ۳- روش های انتقال DNAی هدف به کلروپلاست ۹

۱-۴-۳-۱- تراریختی کلروپلاستی به روش پرتاب ذره ای ۹

۱-۴-۳-۲- تراریختی با استفاده از PEG ۱۰

۱-۴-۳-۳- تراریختی کلروپلاستی به روش ریز تزریقی ۱۱

۱-۴-۳-۴- تراریختی کلروپلاست با استفاده از فاژ *phiC31* ۱۲

۱-۴-۴- طراحی ناقل برای تراریختی کلروپلاست ۱۲

۱-۴-۴-۱- محل های مخصوص درج ژن در کلروپلاست ۱۵

۱-۴-۴-۲- ناقل های عمومی در مقابل ناقل های اختصاصی برای گونه های گیاهی ۱۶

۱-۴-۴-۳- ژن های نشانگر گزینشی برای کلروپلاست ۱۷

۱-۴-۴-۴- طراحی ژن ۱۸

۱-۴-۴-۵- ناقل‌های پلی سیسترونی ۱۹

۱-۴-۵- فرایند تراریخت شدن کلروپلاست ۲۱

۱-۵- پروتئینهای نوترکیب ۲۳
فصل دوم مروری بر مطالعات ۲۸
۲-۱- تاریخچه تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان ۲۹
۲-۲- تولید پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست ۳۱
۲-۲-۱- کاربرد مهندسی ژنوم کلروپلاست در زمینه های کشاورزی مولکولی، مهندسی صفات زراعی و مسیرهای متابولیک ۳۳
۲-۲-۲- افزایش بیان پروتئین های نوترکیب در گیاهان تراریخت کلروپلاستی ۳۴
۲-۲-۳- مهندسی ژنوم کلروپلاست در گیاهان زراعی ۳۶
۲-۳- تولید اینترفرون گامای نوترکیب در گیاه ۳۶
فصل سوم مواد و روش ها ۳۸
۳-۱- مواد و محیط های کشت ۳۹
۳-۱-۱- محیط کشت باکتری ۳۹
۳-۱-۲- تهیه محلول ذخیره از باکتری ۳۹
۳-۱-۳- تهیه باکتری ها و ناقل ها ۴۰
۳-۲- استخراج پلاسمید از باکتری ۴۲
۳-۳-تهیه سازه کلروپلاستی حاوی ژن اینترفرون گاما ۴۴
۳-۳-۱- تکثیر ژن اینترفرون گاما ۴۴
۳-۳-۲- همسانه سازی ژن *ifnG* در ناقل pTZ57R/T ۴۶
۳-۳-۳- هضم آنزیمی ناقل pTZ57R/T واجد قطعه *ifnG* ۴۷
۳-۳-۴-هضم آنزیمی ناقل pKCZ ۴۸
۳-۳-۵-کلون کردن قطعه DNA اینترفرون گاما در ناقل pKCZ ۴۸
۳-۳-۶-انتقال ناقل حامل ژن اینترفرون گاما به باکتری *E. coli* ۴۹
۳-۴- آنالیز مولکولی ناقل کلروپلاستی حامل ژن اینترفرون گاما ۵۰

۳-۵- تراریختی کلروپلاستی گیاه توتون ۵۱
۳-۵-۱- کاشت بذور توتون ۵۱
۳-۵-۲- تهیه محیط کشت باززایی برای توتون ۵۲
۳-۵-۳- پیش تیمار برگ‌های توتون ۵۲
۳-۵-۴- آماده سازی ذرات حامل ناقل حاوی ژن هدف ۵۳
۳-۵-۵- پوشاندن ذرات طلا با DNA ۵۳
۳-۵-۶- تراریختی کلروپلاست توتون از طریق بمباران ذره ای ۵۴
۳-۵-۷- تراریختی برگ های گیاه توتون با ذرات ناقل حاوی DNA ۵۴
۳-۵-۸- نگهداری برگ‌های تراریخت شده پس از شلیک ۵۴
۳-۵-۹- حذف گیاهان مقاوم غیر تراریخت ۵۵
۳-۶- آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت کلروپلاستی ۵۵
۳-۶-۱- آزمون گیاهان تراریخت با استفاده از روش PCR ۵۵
۳-۶-۱-۱- استخراج DNAی ژنومی از گیاهان تراریخت و غیر تراریخت ۵۶
۳-۶-۱-۲- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA استخراجی ۵۸
۳-۶-۱-۳- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۵۹
۳-۶-۲- تأیید درج ژن در محل صحیح آن درون ژنوم کلروپلاست ۵۹
۳-۶-۳- آزمون سادرن بلات برای تایید هموپلاسمی ۶۰
۳-۶-۳-۱- تهیه کاوشگر ۶۰
۳-۶-۳-۲- هضم آنزیمی ۶۱
۳-۶-۳-۳- مراحل انجام آزمون سادرن بلات ۶۱
۳-۶-۴- بررسی بیان در گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح RNA ۶۳
۳-۶-۴-۱- استخراج RNA ۶۳
۳-۶-۴-۲- بررسی کمیت و کیفیت RNA ۶۴

۳-۶-۴-۳- ساخت cDNA ۶۵
۳-۶-۵- بررسی بیان ژن در سطح پروتئین ۶۵
۳-۶-۵-۱- استخراج پروتئین کل محلول از برگهای توتون ۶۵
۳-۶-۵-۲- اندازه گیری کمیت پروتئین به روش برادفورد ۶۶
۳-۶-۵-۳- رسم منحنی استاندارد و فرمول سنجش پروتئین ۶۶
۳-۶-۵-۴- الکتروفورز پروتئین ها بر روی ژل SDS-PAGE ۶۷
۳-۶-۵- ۵- آزمون دات بلات ۷۰
۳-۶-۵-۶- آزمون وسترن بلات ۷۲
۳-۶-۵-۷- آزمون الایزا (ELISA) ۷۳
فصل چهارم نتایج، بحث و پیشنهادات ۷۶
۴-۱- همسانه سازی قطعه DNA اینترفرون گاما (*ifnG*) در ناقل کلروپلاستی pKCZ ۷۷
۴-۱-۱- تکثیر *ifnG* با استفاده ازآغازگر های اختصاصی به وسیله PCR ۷۷
۴-۱-۲- همسانه سازی ژن *ifnG* در ناقل pTZ57R/T ۷۸
۴-۱-۳- استخراج و هضم آنزیمی ناقل جدید pTZ57R/T واجد ژن *ifnG* ۸۰
۴-۱-۴- استخراج و هضم ناقل کلروپلاستی pKCZ ۸۰
۴-۱-۵- همسانه سازی ژن اینترفرون گاما در ناقل pKCZ و تایید آن ۸۱
۴-۲- تراریخت نمودن سلول‌های توتون با ناقل حاوی *ifnG* به وسیله روش بیولیستیک ۸۴
۴-۲-۱- محیط کشت باززایی برای توتون ۸۴
۴-۲-۲- آماده سازی ریز نمونه های توتون برای تراریختی ۸۵
۴-۲-۳- انتقال ناقل pKCZ-*ifnG* به سلول های برگ‌های توتون به وسیله تفنگ ژنی ۸۶
۴-۲-۴- انتخاب گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک ۸۷
۴-۲-۵- باززایی گیاهان تراریخت توتون در چندین نسل جهت دستیابی به هموپلاسمی .. ۸۸
۴-۲-۶- حذف گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک در اثر جهش‌های نقطه ای ۸۸

۴-۲-۷- بذرگیری از گیاهان تراریخت توتون ۸۹
۴-۳- آنالیز مولکولی گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی حاوی ژن اینترفرون گاما ۹۰
۴-۳-۱- آنالیز مولکولی گیاهان توتون تراریخت کلروپلاستی در سطح DNA ۹۱
۴-۳-۲- بررسی هموپلاسمی از طریق آزمون سادرن بلات ۹۲
۴-۳-۳- بررسی بیان ژن *ifnG* در سطح RNA در گیاهان تراریخت کلروپلاستی توتون ۹۳
۴-۳-۴- بررسی بیان ژن *ifnG* در گیاهان تراریخت کلروپلاستی توتون در سطح پروتئین ۹۴
۴-۳-۴-۱- بررسی بیان ژن اینترفرون گاما با استفاده از SDS-PAGE ۹۴
۴-۳-۴-۲- بررسی بیان ژن *ifnG* در گیاهان تراریخت کلروپلاستی توتون با استفاده از Dot blot ۹۵
۴-۳-۴-۳- بررسی بیان ژن *ifnG* در گیاهان تراریخت کلروپلاستی توتون با استفاده از وسترن بلات ۹۵
۴-۳-۴-۴- اندازه گیری میزان پروتئین اینترفرون گاما با استفاده از روش ELISA ۹۶
۴-۴- بحث و نتیجه گیری ۹۹
۴-۵- پیشنهادات ۱۰۸
فهرست منابع ۱۰۹
ضمائم ۱۱۸
۶-۱-الکتروفورز ژل آگاروز ۱۱۹
۶-۲- تهیه ژل آگاروز ۱۱۹
۶-۳-تهیه بافر نمونه گذاری Loading Bufeer 6X ۱۲۰
۶-۴-تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۱۲۰
۶-۵- تهیه سلولهای مستعد (Competent Cells): ۱۲۰
۶-۶- محیط کشت گیاهی MS ۱۲۱

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱- ژنوم کلروپلاست ۷

شکل ۱-۲- شماتیکی از سازه مخصوص انتقال ژن به کلروپلاست ۱۴

شکل ۱-۳- طرح تلفیق کاست های پیشبرنده- لیدر (PL) و خاتمه دهنده (T)..... ۱۹

شکل ۱-۴- تراریختی پلاستید با ناقل pPRV110L پلی سیسترونی loxP..... ۲۰

شکل ۱-۵- مراحل انتقال ژن به ژنوم کلروپلاست و رسیدن به هموپلاسمی..... ۲۲

شکل ۱-۶- ساختار پروتئین اینترفرون گاما، سمت چپ منومر و سمت راست دایمر..... ۲۶

شکل ۳-۱- نقشه ناقل همسانه سازی pTZ57R/T و جایگاه آنزیم های برشی..... ۴۰

شکل۳-۲- نقشه فیزیکی ناقل تراریختی پلاستیدی pKCZ ۴۱

شکل ۳-۳- نقشه ژنوم پلاستیدی گیاه توتون..... ۴۲

شکل ۴-۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪..... ۷۸

شکل ۴-۲- نتایج Clony PCR بر روی کلون های رشد کرده در محِط انتخابگر..... ۷۸

شکل ۴-۳- نتیجه بلاست توالی ژن اینترفرون گاما با توالی های موجود در NCBI ۷۹

شکل ۴-۴- هضم آنزمی ناقل pTZ57R/T واجد ژن *ifnG* به وسیله *Nco*I ۸۰

شکل ۴-۵- الکتروفورز ناقل تخلیص شده و ناقل هضم شده pKCZ بر روی ژل آگاروز..... ۸۱

شکل ۴-۶- سازه pKCZ-*ifnG* ۸۲

شکل ۴-۷- نتایج Colony PCR بر روی ژل آگاروز..... ۸۳

شکل ۴-۸- تعیین جهت صحیح ژن باآغازگرهای اختصاصی و PCR..... ۸۳

شکل ۴-۹- هضم آنزیمی ناقل pKCZ استخراج شده از کلون های PCR مثبت..... ۸۴

شکل ۴-۱۰- گیاه توتون دارای برگ‌های مناسب برای تراریختی..... ۸۵

شکل ۴-۱۱- برگ توتون بر روی محیط کشت RMOP قبل از شلیک..... ۸۵

شکل ۴-۱۲- قطعات بریده شده برگ توتون پس از شلیک روی محیط کشت انتخابی..... ۸۶

شکل ۴-۱۳- گیاهچه باززا شده در محیط انتخابی.....۸۷

شکل ۴-۱۴- گیاه کاملا رشد یافته و ریشه دار شده در محیط کشت انتخابی.....۸۷

شکل ۴-۱۵-گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین.....۸۹

شکل ۴-۱۶-گیاه تراریخت کلروپلاستی توتون.....۹۰

شکل ۴-۱۷- DNAی کل استخراج شده از برگ گیاهان توتون.....۹۱

شکل ۴-۱۸- نتایج PCR با استفاده از آغازگر های *ifnG* در گیاهان تراریخت.....۹۱

شکل ۴-۱۹- نتایج PCR برای تایید ورود ژن در ژنوم کلروپلاست گیاهان تراریخت.....۹۲

شکل ۴-۲۰- نتیجه آزمون سادرن بلات.....۹۳

شکل ۴-۲۱- نتایج RT-PCR برای تایید رونویسی ژن اینترفرون گاما.....۹۴

شکل ۴-۲۲- آنالیز پروتئین های استخراج شده از گیاهان تراریخت کلروپلاستی و شاهد.....۹۵

شکل ۴-۲۳- بررسی بیان پروتئین اینترفرون گاما با روش دات بلات.....۹۶

شکل ۴-۲۴- نتایج آزمایش وسترن بلات در گیاهان تراریخت.....۹۷

شکل ۴-۲۵- منحنی استاندارد رابطه میزان جذب نور با مقادیر اینترفرون گاما.....۹۷

شکل ۴-۲۶- نتایج الایزا برای گیاهان تراریخت کلروپلاستی و شاهد.....۹۸

فهرست جدول ها

جدول ۱-۱- تعداد هسته‌های گلیکوزیلاسیون در مولکول اینترفرون گامای طبیعی و نوترکیب...۲۵

جدول ۲-۱- پروتئین‌های دارویی، واکسن ها و پروتئین‌های مکمل غذایی.....۳۰

جدول ۳-۱- ترکیب بافرهای مورد نیاز برای استخراج پلاسمی.....۴۳

جدول ۳-۲- برنامه PCR جهت تکثیر cDNA اینترفرون گاما.....۴۵

جدول ۳- ۳- مواد لازم برای واکنش اتصال و حجم مواد.....۴۶

جدول ۳-۴- مواد واکنش هضم آنزیمی ناقل pTZ57R/T واجد ژن ifnG.....۴۷

جدول ۳-۵- مواد واکنش هضم آنزیمی ناقل.....۴۸

جدول ۳-۶- مواد واکنش اتصال قطعه DNA در ناقل pKCZ.....۴۹

جدول ۳-۷- برنامه PCR جهت تایید جهت ژن.....۵۱

جدول ۳- ۸- مواد لازم بافر استخراج CTAB برای ۵۰ml.....۵۶

جدول ۳-۹- بافر شستشو (برای ۵۰ml).....۵۷

جدول ۳-۱۰- مقادیر مورد نیاز برای یک واکنش PCR.....۵۹

جدول ۳-۱۱- برنامه زمانی واکنش PCR برای تایید درج ژن در ژنوم کلروپلاست.....۶۰

جدول ۳-۱۲- دستورالعمل مصرف DNase I ۶۳

جدول ۳-۱۳- ترکیب بافر استخراج.....۶۵

جدول ۳-۱۴- سری های غلظت پروتئین استاندارد BSA برای اسپکتروفتومتر.....۶۷

جدول ۳-۱۵- ترکیب مواد لازم برای تهیه ژل اکریل آمید بر حسب میلی لیتر.....۷۰

جدول ۳-۱۶- مواد لازم برای تهیه PBS.....۷۱

جدول ۴-۱- ترکیب مواد در محیط کشت RMOP.....۸۴

جدول ۴-۲- مقادیر P-value برای گیاهان تراریخت کلروپلاستی در سطح ۵٪.....۹۸

فصل اول مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

هزاران سال است که انسان از گیاهان به عنوان منبع مواد خام و دارو استفاده می کند. از اولین مراحل تمدن، عصاره های گیاهی برای بدست آوردن مصالح فنی و دارو برای کاستن از درد و رنج و درمان بیماری ها استفاده شده است. از اواخر دهه هفتاد بسیاری از پروتئین های درمانی و تشخیصی با ارزش از طریق تحقیقات بیولوژی مولکولی و پزشکی مولکولی، کشف شده اند اما استفاده گسترده از این مولکول ها به دلیل معضلات تولید مانند بازدهی کم، کیفیت پایین و ناسازگاری محصول تولید شده و کمبود ظرفیت تولید، با مشکلاتی مواجه بوده است.

در اواخر دهه ۱۹۸۰، استفاده از فناوری DNA و پروتئین نوترکیب در گیاهان امکان استفاده از سیستم های بیان گیاهی را برای تولید ایمن‌تر و ارزان‌تر پروتئین های دارویی به وجود آورده است. در طول دهه گذشته، گیاهان به عنوان جایگزین مناسب، ایمن و مقرون به صرفه سیستم های بیان اصلی که اساس تولیدشان کشت میکروب ها یا سلول های حیوانی در مقیاس بزرگ و یا تولید حیوانات تراریخت بود، مطرح شده اند. تولید داروها و پروتئین های صنعتی درگیاه به عنوان کشاورزی مولکولی[1] شناخته شده است. در این راستا هدف مهار قدرت کشاورزی برای کشت و برداشت گیاهان یا سلول های گیاهی است که پروتئین های نوترکیب درمانی، تشخیصی، آنزیم های صنعتی و ترکیبات شیمیایی با منشاء گیاهی[2] تولید می کنند. کشاورزی مولکولی دارای پتانسیل لازم برای فراهم آوردن مقادیر تقریبا نامحدودی از آنتی بادی های نوترکیب، واکسن ها، جایگزین های خونی،

[1] Molecular farming
[2] Green Chemicals

عوامل رشد، سیتوکین ها[1]، چموکین ها[2] و آنزیم ها برای استفاده به عنوان ابـزار تشخیصـی و درمـانی مراقبت های بهداشتی، علوم زیستی و صنایع شیمیایی است. گیاهان در حال کسب پـذیرش گسـترده ای به عنوان یک پلت فرم عمومی بـرای تولیـد پـروتئین هـای نوترکیـب در مقیـاس وسـیع هسـتند. (Fischer and Schillberg, 2006).

۱-۲- روش های بیان پروتئین در گیاهان

اکثر پروتئین‌های نوترکیب تولید شده توسط گیاهان و همچنین غالب تلاش هـای انجـام شـده جهت تغییر صفات آنها از طریق تراریختی ژنوم هسته‌ای و سپس باززایی رده‌های تراریخـت حاصـل از آن ها بدست آمده است. بعد از رشد این دسته ازگیاهان، اسـتخراج و خـالص‌سـازی پـروتئین از بافـت های تراریخت انجام می‌شود. اگرچه امروزه تراریختی هسته‌ای سلول های گیاهانی در بسیاری از گونـه ها بصورت متداول انجام می‌گیرد، ولی این نوع بیان ژن دارای نقـایص متعـددی نیـز مـی‌باشـد کـه از مهمترین آنها می‌توان به حجم کم پروتئین تولید شده در هر گیاه و زمـان طـولانی رشـد گیـاه اشـاره کرد. بیان موقت[3] که عموماً برای بررسی میزان فعالیت ساختارهای ورودی یا تولید اندک پروتئین‌هـای نوترکیب انجام می‌شود، از طریق فیلتراسیون برگ ها در خلا[4] و در حضـور آگروبـاکتریوم امکـان‌پـذیر است. در این صورت میزان زیادی از پروتئین نوترکیب در زمانی کوتاه تولید می‌شود اما برای تولیـد در مقیاس تجاری کافی نیست. روش دیگر تراریختی گیاهـان، اسـتفاده از ویروسـهای گیـاهی بـه عنـوان ناقلین ژن است. گیاهان آلوده به ویروس از فوایدی چون بیان سـریع، پخـش سیسـتمیک ویـروس بـه تمام نقاط گیاه، تولید پروتئین نوترکیب در همه سلول‌ها و امکان استفاده از دو یا چنـد ناقـل بصـورت همزمان برخوردارند. اما نگرانی‌های وسیعی نیز در استفاده از این نـاقلین مطـرح اسـت. از کشـت‌هـای سلولی گیاه نیز می‌توان برای تولید مولکولهای دارویـی اسـتفاده نمـود. مزیـت قابـل توجـه ایـن روش ممانعت از انتشار ژن های خارجی و بیان محصول تحت شرایط کاملاً کنترل شده اسـت (Fischer *et al.*, 2004).

[1] Cytokines
[2] Chemokin
[3] Transient Expression
[4] Vacuum Infiltration

یکی از راهکارهای مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخت، الحاق ژن یا ژن های رمز کننده پروتئین نوترکیب مورد نظر در ژنوم کلروپلاست می باشد که مزایای بسیار زیادی نسبت به تراریختی هسته ای در گیاهان دارد.

۱-۳- مزایای انتقال ژن به کلروپلاست

در اغلب گونه‌های گیاهی نهاندانه، ژن های پلاستیدی توارث مادری دارند و لذا ژن های ورودی در این پلاستید ها به وسیله دانه گرده منتشر نمی شوند. این ویژگی تراریختی پلاستیدها به عنوان ابزار مناسبی برای برقراری همزیستی بین گیاهان عادی و گیاهان تراریخت مطرح است. علاوه بر این، پروتئین های دارویی با منشا گیاهی عاری از عوامل بیماری زای انسانی و ناقلین ویروس های پستانداران هستند. بنابراین پلاستیدها راه مناسب دیگری علاوه بر سیستم های رایج تولید مانند تخمیر میکروبی یا کشت سلول پستانداران برای تولید پروتئین های نوترکیب فراهم می کنند. مزیت دیگر تراریختی پلاستید در صورتی که ژن ورودی به صورت پایدار وارد ژنوم پلاستید شده باشد تجمع مقدار زیادی پروتئین خارجی (بیشتر از ۴۶ درصد از کل پروتئین برگ) است. این ویژگی ناشی از پلی پلوئید بودن سیستم ژنتیکی پلاستید است که بیشتر از ۱۰۰۰۰ نسخه از ژنوم کلروپلاست در هر سلول گیاهی برگ وجود دارد و توانایی حمل تعداد بسیار زیادی از نسخه های ژن عملگر را به گیاه می دهد. علاوه بر این ورود در یک جایگاه خاص درون ژنوم کلروپلاست از طریق نوترکیبی همولوگ توالی های دو طرفه DNA کلروپلاست موجود در ناقل کلروپلاست نگرانی های مربوط به اثرات مکانی را که در لاین های تراریخت هسته ای به وفور دیده می شود، رفع می کند. مزایای دیگری که در گیاهان تراریخت کلروپلاستی وجود دارد این است که خاموشی ژن در آنها دیده نمی شود و تجمع رونوشت ها حدود ۱۶۹ برابر بیشتر از گیاهان با هسته تراریخت و تجمع پروتئین های خارجی بیشتر از ۴۶ درصد کل پروتئین برگ است. مهندسی ژنتیک کلروپلاست همچنین مزیت منحصر به فرد transgene stacking را دارد یعنی بیان همزمان چندین ژن ورودی که فرصتی برای تولید واکسن های چند بنیادی[1] را فقط با یک بار تراریختی فراهم می کند. کلروپلاست های

[1] Multivalent