بنام خداوند جان و خرد

۱۱۱۸۲۷

دانشگاه زابل

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد(M.Sc) در رشته بیوتکنولوژی

عنوان :

ساب کلونینگ ژن آنتی بادی تک دومینی شتری و انتقال آن به گیاه توتون

۱۳۸۸ /۲/۱۵

استادان راهنما:

دکتر محمود سلوکی

دکتر فاطمه رهبری زاده

استادان مشاور:

دکتر رضا شیخ نژاد

مهندس عباسعلی امام جمعه

تهیه و تدوین:

مهدی دادمهر

بهار ۱۳۸۶

۱۱۱۵۳۷

بسمه تعالی

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

تاریخ ۸۶/۴/۴
شماره ۲۷۵۵/ز
پیوست.....

دانشگاه زابل

صفحه الف

این پایان نامه با عنوان:" **ساب کلونینگ ژن آنتی بادی تک دومینی شتری و انتقال آن به گیاه توتون**" **قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی توسط دانشجو مهدی دادمهر تحت راهنمائی استادان پایان نامه آقای دکتر محمود سلوکی و خانم دکتر فاطمه رهبری زاده تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می باشد.**

امضاء دانشجو

این پایان نامه ٦ واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ۸٦/٥/۴ توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۱۹/۹ و درجه **عالی** به آن تعلق گرفت.

نام و نام خانوادگی	**امضاء**	**تاریخ**
۱- استاد راهنما: دکتر محمود سلوکی		
۲- استاد راهنما: دکتر فاطمه رهبری زاده		
۳- استاد مشاور: دکتر رضا شیخ نژاد		
٤- استاد مشاور: مهندس عباسعلی امام جمعه		
٥- استاد داور: دکتر مصطفی حیدری		
٦- نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر مصطفی حیدری		

تشکر و قدردانی:

خدایا به من زیستنی عطا کن که در لحظه مرگ بر بی ثمری لحظه ای که بر زیستن گذشته است حسرت نخورم و مردنی عطا کن که بر بیهودگی اش سوگوار نباشم.بگذار تا آن را من خود انتخاب کنم اما آنچنانکه تو دوست داری .چگونه زیستن را به من بیاموز چگونه مردن را خود خواهم آموخت. (دکتر علی شریعتی)

اکنون که در آستانه گذار از مرحله ای دیگر از دوران تحصیلم قرار گرفته ام بر خود واجب می بینم حق شاگردی را بجا آورده از اساتید و بزرگوارانی که مرا در پیمودن این مسیر طولانی همراهی کردند تقدیر و تشکر کنم .سرکار خانم دکتر رهبری زاده که در قسمت اول این پایان نامه با صبر و جدیت یاریگر من بودند و بدون کمک استاد بزرگوارم انجام این مهم امکانپذیر نبود. جناب آقای دکتر سلوکی که در قسمت دوم کارم با راهنمایی های ارزنده و دلسوزانه و البته با پیگیری خردمندانه شان در طول انجام طرح بطور کامل از من حمایت کردند و با ارزش ترین پشتوانه علمی و اخلاقی دانشگاه زابل به شمار می روند. جناب آقای دکتر رضا شیخ نژاد که بواسطه کشفیات ارزنده شان در درمان سرطان از مفاخر و دانشمندان بنام سیستان بوده و در مبحث مربوط به بیوتکنولوژی پزشکی مرا یاری نمودند و جناب آقای مهندس امام جمعه که از راهنماییهای با ارزش ایشان در طول انجام پایان نامه بهره مند شدم. همچنین از زحمات و کمکهای با ارزش دوست عزیز و گرامیم جناب آقای مهندس محسن مشایخی قدردانی مینمایم که با وجود بعد مسافت محل انجام پایان نامه هایمان همواره مرهون بزرگواریشان بودم.

جای آن دارد که از دوستان و همکاران عزیزم در مرکز بیوسنتر دانشگاه خانمها کروژدهی ، امین فر ، فرازمند ، گنجعلی ، اله دو ،لطفی، مصری و آقایان رخشانی و وهابی تشکر و قدردانی نمایم . از دوستان عزیزم آقایان گریوانی ،ایروانی ،میری،نیکبختی،طالبی و همکلاسیهای بزرگوارم خانمها آرام ،جهانتیغی،کمالی،وارسته و آقای حاجی باقری نیز کمال سپاسگذاری را دارم.

چکیده

آنتی بادی ها و مشتقاتشان بزرگترین و مهمترین گروه محصولات حاصل از بیوتکنولوژی می باشند و اخیرا در مراحل آزمایشات کلینیکی می باشند و ارزشی معادل ۵ بیلیون دلار را در سال ۲۰۰۵ به خود اختصاص دادند(لاریک و همکاران ۲۰۰۱) . تولید یک آنتی بادی IgG در گیاهان تراریخته اولین بار در سال ۱۹۸۹ بیان شد که به بیان همزمان دو محصول ژن نوترکیب منجر شد و مولکولهای مولتی مری در گیاهان را بیان کرد که از لحاظ عملکرد شبیه انواع موجود در پستانداران بودند(هیات و همکاران ۱۹۸۹).به خاطر محدودیتهای بیوشیمیایی، فنی و اقتصادی در تولید داروهای زیستی، نیازمند به سیستمهای تراریختی جدیدی جهت پاسخگویی به تقاضای رو به افزایش این داروها می‌باشیم. توانایی گیاهان در تولید پروتئین های دارویی ارزان تر، ایمن تر و دارای فعالیت زیستی مناسب به میزان زیادی گزارش شده است و آنتی بادی‌های مختلفی در گیاهان تولید شده است. آنتی‌بادی تک دومنی با منشاء شتری (VHH) که خانواده جدیدی از آنتی بادی های می باشد بعلت ویژگی‌هایی مانند اندازه کوچک، پایداری و حلالیت بالا، اختصاصی بودن و تشابه زیاد با زنجیره سنگین آنتی‌بادی انسانی بر دیگر اشکال آنتی‌بادی ترجیح داده می‌شود و اهمیت به سزایی در بیوتکنولوژی دارد. برای اولین بار در جهان جداسازی و تولید آنتی‌بادی مونوکلونال تک دومنی علیه MUC1 (تومور مارکر شایع در اکثر سرطانها) از منشاء شتر دو کوهانه (Camelus bactrianus) انجام گرفت. به منظور ارزیابی بیان و فعالیت زیستی این آنتی بادی تک دومنی در گیاه توتون، ژن VHH مذکور با کمک آغازگرهای اختصاصی و طی PCR تکثیر گردید در ادامه VHH تکثیر شده پس از الکتروفورز از ژل بریده شد و Purify گردید و در ناقل T/A کلون شد و سپس در ناقل بیانی گیاهی pBI121 جایگزین ژن GUS گردید. این ژن با استفاده از روش آگروباکتریوم وارد دیسکهای برگی گردید وپس از مرحله Co-cultivation ؛ گیاهان تراریخت روی محیط کشت باززایی حاوی کانامایسین باززایی شدند. در ادامه حضور ژن آنتی‌بادی نوترکیب در DNA ژنومی گیاهان تراریخت با کمک PCR نیز تایید شد.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: بررسی منابع ۹

۲-۱) سیستم ایمنی ۱۰

۲-۲) ایمونوگلوبولین ها ۱۰

۲-۲-۱) ساختمان آنتی بادی ۱۱

۲-۲-۲) آنتی بادی های پلی کلونال و مونوکلونال ۱۲

۲-۲-۳-)آنتی بادی های نوترکیب ۱۳

۲-۴)آنتی ژن MUC1 و آنتی بادی تراپی ۱۷

۲-۵) تولید VHH علیه MUC1 ..... ۱۸

۲-۶) تولید آنتی بادیها در گیاهان ۱۹

۲-۶-۱) گیاهان مناسب برای تولید پروتئین های نوترکیب ۲۱

فصل سوم: مواد و روشها ۲۴

۳-۱) همسانه سازی ژن آنتی بادی در ناقلها ۲۵

۳-۱-۱) مواد شیمیایی، آنزیم‌ها و کیت‌ها ۲۵

۳-۱-۲) باکتری‌ها و پلاسمیدها ۲۵

۳-۱-۳) محیط کشت ۲۸

۳-۱-۴) آنتی بیوتیکها ۲۹

۳-۱-۵) آغازگرها ۳۰

۳-۱-۶) تکثیر ژن VHH ۳۲

۳-۱-۷) تخلیص پلاسمید به روش Mini-Preparation ۳۳

۳-۱-۸) اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA ۳۴

۳-۱-۹) الکتروفورز با ژل آگارز ۳۵
۳-۱-۱۰) تهیه سلول‌های مستعد E. coli (Competent cell) ۳۸
۳-۱-۱۱) همسانه سازی ژن VHH در ناقل T/A ۴۰
۳-۱-۱۲) تأیید همسانه سازی ژن VHH در ناقل T/A ۴۲
۳-۱-۱۲-۱) واکنش PCR و هضم آنزیمی ۴۳
۳-۱-۱۳) همسانه سازی ژن آنتی بادی در ناقل بیانی گیاهی (pBI121) ۴۳
۳-۱-۱۴) تأیید همسانه سازی ژن VHH در ناقل نوترکیب pBI121 ..... ۴۵
۳-۱-۱۵) انتقال پلاسمیدهای pBI121 نوترکیب به اگروباکتریوم ۴۶
۳-۲) کشت بافت گیاهی و انتقال ژن ۴۸
۳-۲-۱) محیط‌های کشت گیاهی ۴۸
۳-۲-۱-۱) محیط کشت گیاهی MS ۴۸
۳-۲-۱-۲) محلولهای ذخیره‌ای هورمون‌های گیاهی ۴۹
۳-۲-۱-۳) تهیه محیط کشت MS ۱/۲ ..... ۴۹
۳-۲-۱-۴) تهیه محیط MS کامل ۵۰
۳-۲-۲) تراریخت نمودن گیاه توتون با ژن آنتی بادی ۵۱
۳-۲-۲-۱) تولید گیاهان استریل توتون در محیط MS ۱/۲ ..... ۵۲
۳-۲-۲-۲) تراریختی گیاه توتون ۵۲
۳-۲-۳) بهینه سازی روش انتقال ژن به توتون ۵۴
۳-۳)بررسی گیاهان تراریخت ۵۵
۳-۳-۱) بررسی گیاهان تراریخت در سطح DNA ۵۵
۳-۳-۱-۱) تهیه DNA ژنومی از گیاه توتون ۵۵
۳-۳-۱-۲) آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از PCR ۵۸

فصل چهارم: نتایج و بحث ۶۰

۴-۱) همسانه سازی ژن آنتی بادی VHH در ناقلها ۶۱

۴-۱-۱- آغازگرهای طراحی شده ۶۱
۴-۱-۲)تکثیر ژن آنتی بادی VHH ۶۱
۴-۱-۳) قطعه ژن VHH کلون شده در ناقلT/A ۶۳
۴-۱-۴) کلون کردن قطعه ژن VHH در ناقل بیانی گیاهی pBI121 ..... ۶۴
۴-۱-۵) تایید کلونینگ در ناقل pBI-VHH ۶۶
۴-۱-۶) انتقال ناقل pBI-VHH به آگروباکتریم ۶۷
۴-۲)انتقال ژن VHH به گیاه توتون ۶۸
۴-۲-۱) تولید نوساقه‌های تراریخت ۶۸
۴-۳) آنالیز گیاهان تراریخت ۷۰
۴-۳-۱) استخراج DNAی ژنومی از گیاه توتون ۷۰
۴-۳-۲) آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA ۷۰
۴-۴)بحث ۷۱
منابع ۷۹

فهرست شکلها

عنوان ..... صفحه

شکل ۱-۲. ساختمان ملکول ایمونوگلوبولین..... ۱۱

شکل۲ -۲. شکل شماتیک از آنتی‌بادیهای معمولی..... ۱۶

شکل ۱-۳. ناقل T/A (pTZ57R) و نواحی مهم آن..... ۲۳

شکل ۲-۳. ناقل pBI121..... ۲۴

شکل ۳-۳. طراحی آغازگرها..... ۲۷

شکل ۴-۳. ترادف ژن VHH با منشا شتری..... ۲۷

شکل۱-۴ محصول PCR با آنزیم پلیمرازی Taq بر روی ژل آگارز ۱٪..... ۵۲

شکل ۲-۴- تایید همسانه سازی ژن VHH (در حامل T/A) با استفاده از روش Jumping..... ۵۴

شکل ۳-۴- هضم آنزیمی ناقل نوترکیب پلاسمید pBI121 ..... ۵۵

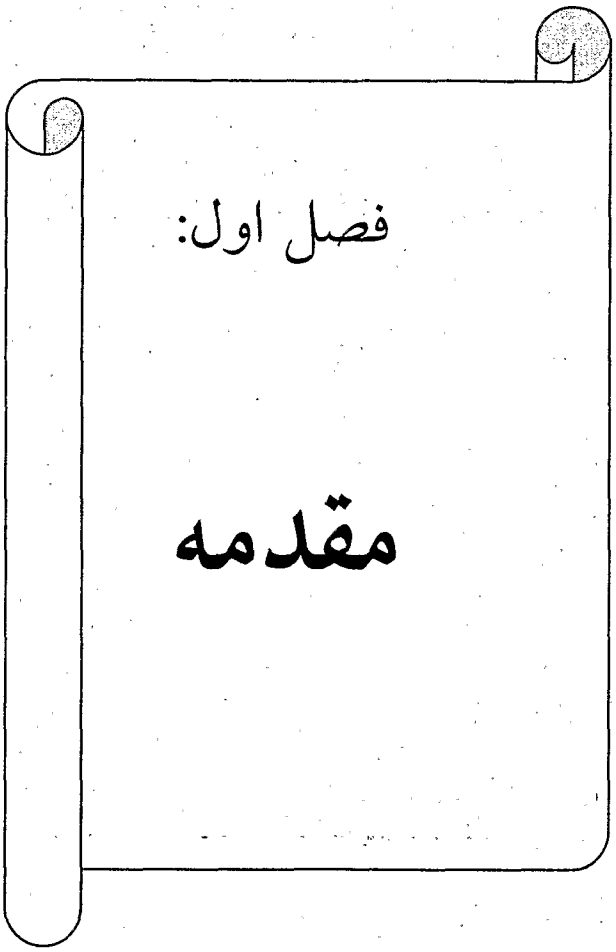
شکل ۴-۴- کلونینگ قطعه ژن آنتی بادی VHH در ناقل بیان گیاهی (pBI121)..... ۵۶

شکل ۵-۴: نتایج حاصل از PCR کلنی باکتریهای رشد یافته روی محیط کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۷

شکل ۶-۴- تاییدحضور قطعه ژنVHH در آگروباکتریوم (Agrobacterium tumefaciens) با استفاده از Colony PCR..... ۵۸

شکل ۷-۴: تولید نوساقه نابجا از ریزنمونه های توتون..... ۵۹

شکل ۸-۴: - آنالیز گیاهچه های باززایی شده بوسیله PCR..... ۶۱


فصل اول:
مقدمه

مقدمه

امروزه سیستم های کشاورزی مبتنی بر تولید محصولات تراریخته به آسانی با اقتصاد و بازار سازگار می باشند. از طرفی وابستگی به ترکیبات دارویی ممکن است توسعه کشاورزی مولکولی را در آزمایشگاهها، گلخانه ها یا حتی در مقیاس مزرعه ای موجب شود. برای بعضی تولیدات تغییر یافته ژنتیکی به مکان خیلی کوچکی نیاز است مثلاً یک گلخانه کوچک می تواند نیاز به بعضی داروهای درمانی گران قیمت را مرتفع سازد. بطور نمونه تخمین زده شده که دویست و پنجاه هزار متر مربع گلخانه برای رشد و تولید سیب زمینی تراریخته حاوی واکسن ویروس هپایت B می تواند تقاضای سالیانه جهانی را تأمین نماید. برای تولید بعضی محصولات از جمله برای تولید پلاستیکهای زیستی قابل تجزیه نیز به هزاران یا میلیونها هکتار زمین نیاز است.

ایده استفاده از واکسنهای خوراکی این است که افراد به عنوان بخشی از جیره غذایی خود، با خوردن گیاهانی که این واکسنها را تولید می کنند دز مورد نیاز خود را دریافت نمایند. گیاهان تراریخت نقاط امیدی از سیستمهای تولید واکسن کم هزینه را نشان می دهند و مزایایی نسبت به حیوانات دارند از جمله اینکه ۱- کشت سلولهای حیوانی در مقیاس وسیع به سبب نیاز به مواد کشت و همچنین نیاز به شرایط رشدی پایدار و دقیق گران است در حالیکه تولید تجاری گیاهان تراریخت در مقیاس وسیع در آزمایشگاهها آسانتر و مقرون به صرفه تر است ۲- خطر آلودگی به

ویروس و وجود عوارض جانبی مانند افزایش احتمال لخته شدن خون در حیوانات در حالیکه این شرایط در عالم گیاهی وجود ندارد و ۳- رشد و کشت سلولهای گیاهی ارزان است و تستهای آزمایشگاهی نیز آسانتر انجام می شود. بنابراین جذابیت بیشتری در استفاده از گیاهان به عنوان سیستمهای تولید پروتئینهای نوترکیب و سایر مواد شیمیایی ویژه وجود دارد.

Pharming لغتی است که به دیکشنری اضافه شده برای نشان دادن نوعی سیستم جدید برای بدست آوردن داروها، برای مثال امروزه واکسن های خوراکی به عنوان سیستم تحویل مناسب در واکسیناسیون جهانی شناخته شده اند. بیوتکنولوژی استفاده شده در مهندسی گیاهان، شامل ژن مشتق شده از پاتوژن انسانی است که بر این اساس پروتئینی علیه پاتوژن توسط DNA خارجی در بافتهای گیاهی تغییر یافته، تولید و ذخیره می شود. نتایج بدست آمده از تست های کلینیکی نشان داده که این پروتئینهای بدست آمده از گیاهان تراریخته توانایی ایجاد خاصیت ایمنی را دارند. این پروتئینها، آنتی بادیهای ویژه ای را در موشهایی که این گیاهان تراریخت را خورده اند ایجاد کرده اند و این موشها ایمنی نشان داده اند. آراکاوا و همکاران(۱۹۹۸) نشان دادند که محصولات غذائی تراریخته برای افزایش ایمنی حفاظت شده در موشها بر علیه سمهای باکتریایی مانند کلروتوکسین B مؤثر بوده است. همچنین از غده های سیب زمینی تراریخته بطور موفقیت آمیزی استفاده شده به عنوان آنتی بادی نوترکیب تک رشته ای که نسبت به موارد مشابه بدست آمده از روشهای دیگر دارای بازدهی بالاتری بوده است .

اولین پروتئین دارویی مشتق شده از گیاهان نوترکیب سرم آلبومین انسانی بوده است که در سال ۱۹۹۰ در توتون و سیب زمینی تراریخته تولید شد ، چهارده سال بعد یعنی در سال ۲۰۰٤ اولین پروتئینهای تولید شده در گیاهان تراریخت وارد بازار شدند و نقطه آغازی برای تولید

بسیاری از پروتئینهای درمانی مانند آنتی بادیها، فاکتورهای رشد، هورمونها، سیتوکینینها، آنزیمهای نوترکیب و واکسنهای انسانی و دامپزشکی بودند .

کشاورزی مولکولی هم اینک به بلوغ رسیده است ولی توسعه تکنولوژیکی در چندین سطح از جمله روشهای انتقال ژن، کنترل بیان ژن، کنترل پروتئینهای هدف، ذخیره پروتئین و استفاده از محصولات متفاوت برای اهداف متفاوت لازم است همچنین اصلاحاتی در جهت تغییر خاصیت، ساختمان و عمل این محصولات بایستی صورت گیرد. یکی از مهمترین فاکتورهای بهبود عملکرد، تولید محصولات دارای اثر معنی دار روی اقتصاد می باشد. استراتژیهایی در جهت بهبود عملکرد پروتئین نوترکیب در گیاهان از جمله توسعه پروموتورهای جدید، بهبود پایداری و ذخیره پروتئین در بافت هدف و بهبود تکنیک های ارزیابی در فرآیند تولید لازم است. امروزه فعالیتها برای سوق دادن تحقیقات اساسی و بنیادی به سمت بهره برداری تجاری از این تکنولوژی متمرکز شده اند. زراعت مولکولی به مرحله ای رسیده که روشهای قبلی مانند تولید در باکتریها، میکروارگانیسمها و سلولهای کشت شده در محیط های کشت را به مبارزه طلبیده است.

گیاهان تراریخته در طی ربع قرن گذشته تکامل داشته و از گیاهان ساده‌ای که تنها ژنهای گزارشگر یا نشانگر قابل انتخاب را در خود تظاهر می‌دادند به گیاهانی که چندین صفت مطلوب را در خود تظاهر می‌دهند و گیاهانی که می‌توانند برای تولید واکسن، آنتی‌بادی و سایر داروهای پزشکی مورد استفاده قرار گیرند تکامل یافته‌اند. به دنبال اولین انتقال ژن موفق به گیاهان در سال ۱۹۸۳ نسل اول گیاهان تراریخته با انتقال ژنهای نشانگر قابل انتخاب (نظیر ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک) و ژنهای گزارشگر (نظیر gus) پا به عرصه تحقیق و توسعه گذاشت. از اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی به تدریج نسل دوم گیاهان تراریخته پا به عرصه تولید گذاشت. این گروه از گیاهان

تراریخته علاوه بر دارا بودن ژنهای نشانگر قابل انتخاب نظیر hpt و npt و گاهی ژنهای گزارشگر نظیر gfp و gus، دارای حداقل یک ژن با ارزش زراعی نظیر ژنهای cry 1Ab و غیره بودند. روند رشد سطح زیر کشت محصولات تراریخته طی یک دهه و بدون وقفه به طور صعودی ادامه یافت تا جایی که در انتهای سال ۲۰۰۵ به بیش از ۹۰ میلیون هکتار رسید و به صورت تجمعی طی این دهه ٤۰۰ میلیون هکتار محصول تراریخته توسط ۸/۵ میلیون کشاورز در ۲۱ کشور جهان به زیر کشت رفت (قره یاضی، ۱۳۸٦). این سرعت پذیرش بالای غیر قابل پیش بینی، انعکاسی از اطمینان و اعتماد میلیونها کشاورز به سودآوری و سلامت محصولهای حاصل از فن‌آوری زیستی بوده است. همزمان با آغاز تولید انبوه و تجاری گیاهان تراریخته نسل دوم تحقیقات برای تولید گیاهان تراریخته نسل سوم (گیاهانی که بیش از یک ژن با ارزش اقتصادی و زراعی را بیان می کنند) وارد مرحله جدیدی شد. از ابتدای هزاره سوم میلادی این قبیل گیاهان که به تظاهر همزمان ژنهای مقاومت به آفات و تحمل به علف‌کش‌ها محدود می‌شود به زیر کشت رفت. در حال حاضر ۱۰/۱ میلیون هکتار (۱۱٪ از کل سطح زیر کشت محصولات تراریخته) به این گیاهان اختصاص دارد و بیشترین رشد را بین سالهای ۲۰۰٤ تا ۲۰۰۵ داشته است (قره یاضی، ۱۳۸٦). گیاهان تراریخته نسل چهارم گیاهانی هستند که به اهداف استفاده‌های پزشکی و بهداشتی تولید می‌شوند. بر اساس اعلام رسمی سازمان بهداشت جهانی علل مرگ و میر سالیانه ۵۵۹٦۵۰۰۰ نفر از جمعیت حدود ٦ میلیارد نفر مردم جهان به شرح زیر است:

بیماریهای قلبی و عروقی: ۱۷ میلیون؛ بیماریهای عفونی: ۱٤ میلیون نفر؛ سرطان: ۷ میلیون نفر؛ سوانح و تصادفات (مشتمل بر جنگها): ۵ میلیون نفر.

بنابراین برای درمان این بیماریها نیاز به منابع و سیستمهای مناسب و اقتصادی جهت تولید داروهای مربوطه می باشد. رویکرد جدید پژوهشگران و شرکتهای بزرگ چند ملیتی داروسازی جهان به سمت داروهای تولید شده در گیاهان (Plant made pharmaceuticals) یا PMP می‌باشد (Fischer and Schillberg, 2004). به طور کلی تولید پروتئین های نوترکیب درمانی در گیاهان دارای مزایای متعددی است که مهمترین آنها به شرح زیر است:

١- از نظر اقتصادی سیستم‌های بیان گیاهی نسبت به سیستم‌های تخمیری و بیوراکتورها، به صرفه تر و ارزان ترند. ارزش تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان بسته به نوع گیاه می تواند ١٠ تا ٥٠ برابر ارزان تر از تولید همان پروتئین‌ها در فرمانتاسیون باکتری (*Escherichia coli*) باشد (Giddings *et al.*, 2000). هزینه تولید پروتئین IgG در گیاه یونجه حدود ٦٠٠-٥٠٠ دلار به ازای هر گرم است که این میزان در مقایسه با قیمت تمام شده تولید همین آنتی‌بادی در سیستم هیبریدوما (٥٠٠٠ دلار) بسیار ارزانتر است (Kusnadi و همکاران به نقل از Giddings *et al.*, 2000).

٢- امکان تولید انبوه پروتئینهای نوترکیب وجود دارد. تخمین زده می‌شود که میزان تولید پروتئین‌ها در گیاهانی نظیر تنباکو، سویا و یونجه بیش از ١٠ کیلوگرم به ازای هر ٠/١ هکتار باشد.

٣- امکان استفاده خوراکی از گیاهان وجود دارد و لذا می‌توان از فرآیندهای پیچیده تخلیص صرف‌نظر نمود.

٤- امکان بیان پروتئین مورد نظر در اندام خاصی از گیاه (نظیر برگ، ریشه و یا دانه) یا در اندامک خاصی از سلول (نظیر کلروپلاست، امیلوپلاست و ...) وجود دارد. پروتئین‌هایی

که در دانه گیاه تولید می‌شوند پایداری فوق‌العاده زیادی دارند. به عنوان مثال آنزیم‌ها و آنتی‌بادیهای تولید شده در دانه گیاه را می‌توان بدون کاهش قدرت کاتالیتیکی و یا تمایل اتصال به آنتی‌ژن بیش از ۳ سال در یخچال نگهداری کرد.

۵- سبب کاهش خطر ناشی از آلودگی به پاتوژنهای عامل بیماریهای انسان (مثل HIV و HSV) و یا سموم بالقوه خطرناک می شود.

٦- برخلاف باکتریها، گیاهان می توانند پروتئین‌های مولتی‌مر (یا دارای چند زیر واحد) نظیر آنتی‌بادیها را در شکل صحیح خود تولید کنند.

در مجموع تولید پروتئین های درمانی در گیاهان خیلی اقتصادی بوده و فوائد کیفی زیادی دارد و نکته مهمتر آن است که کاشت، داشت، برداشت، ذخیره و فرآوری محصولات تراریخت می تواند با استفاده از زیرساخت های موجود در کشور صورت گیرد و نیازمند سرمایه گذاری های کمی می باشد که در نتیجه دورنمای جالبی از تولید تجاری داروهای زیستی (مثل واکسن، آنتی بادی، هورمون و غیره) در گیاهان را به خصوص برای کشورهای جهان سوم ارائه می دهد.

از نظر میزان مصرف در آزمایشهای بالینی، آنتی‌بادیها بزرگترین گروه مولکولهای پروتئینی را تشکیل می دهند و حدود ۳۰٪ داروهای زیستی نوترکیب منشا ایمیونوگلوبولینی دارند. این پروتئینها نقش درمانی و تشخیصی زیادی در آزمایش های کلینیکی دارند که یکی از مهمترین آنها در تشخیص سلولهای سرطانی (به عنوان tomur associated marker) می باشد. برخی شرکتهای بزرگ دارویی تا ۲۲ میلیارد دلار از محل فروش این محصولات درآمد دارند (Joosten *et al.*, 2003). بطور کلی دانشمندان جهت افزایش کارایی و میزان تولید آنتی بادیها دو راهبرد اساسی را مورد توجه قرار داده اند: در یک راهبرد می خواهند با استفاده از مهندسی آنتی بادی (Antibody

engineering) به آنتی بادیهایی با کارایی و خصوصیات ایده آل دست یابند و در راهبرد دیگر قصد دارند به سیستمهای تولیدی اقتصادی مناسب جهت تولید این پروتئینهای نوترکیب دست یابند.

امروزه علاوه بر اینکه انواع متعددی از آنتی بادیهای مونوکلونال شناسایی شده است، دانشمندان نیز با الگوبرداری از طبیعت متفاوت تولید آنتی بادی در جانداران مختلف، موفق به دستورزی های ژنتیکی در این زمینه گردیده اند. پژوهشگران با استفاده از روشهای مهندسی آنتی بادی همانند افزایش قدرت تمایل به آنتی ژن (مثلاً با ایجاد جهش تصادفی در دومن متغیر CDR3)، کاهش اندازه ملکول (کاهش اندازه طول ژن کد کنند آنتی بادی) و تک زنجیره ای کردن ملکول توانسته اند به آنتی بادیهایی با خصوصیات ایده آل دست یابند (Conrad and Fiedler, 2001). تمام این تحقیقات در اصل تقلیدی از ایمونوگلوبولینهای بعضی از جانداران است که به طور طبیعی در طبیعت یافت می شوند. آنتی بادیهای معمولی دارای دو زنجیره سبک و سنگین هستند، ولی طی سالهای اخیر در شتر و کوسه ماهی طبقه جدیدی از آنتی بادیها (به نام VHH) کشف شده است که فاقد زنجیره سبک هستند. این کلاس جدید از آنتی بادیها بعلت ویژگی‌هایی مانند اندازه کوچک، سادگی کلونینگ، بیان بالا، پایداری و حلالیت بالا، اختصاصی بودن و تشابه زیاد با زنجیره سنگین آنتی‌بادی انسانی بر دیگر اشکال آنتی‌بادی ترجیح داده می‌شود. امروزه محققین تمایل زیادی در استفاده از این آنتی بادیها در آزمایشهای بالینی دارند. رهبری زاده و همکاران توانستند برای اولین بار در دنیا تولید آنتی بادی های جدید تک دومنی نوترکیب از منشا شتر دوکوهانه علیه تومور مارکر MUC1 (که در اکثر سلولهای سرطانی رایج است) را گزارش نمایند (Rahbarizadeh *et al.*, 2004b).

فصل دوم:

کلیات و

بررسی منابع

۱-۲- سیستم ایمنی

لنفوسیتها سلولهای اصلی دستگاه ایمنی بدن می باشند و دوگونه اند که دارای قدرت ایمنی متفاوتی بوده و عبارتند از: لنفوسیتهای T (لنفوسیتهای با مبدأ تیموس) که در پاسخهای ایمنی سلولی شرکت می کنند و دیگری لنفوسیتهای B (لنفوسیتهای با مبدأ مغز استخوان یا معادل آن) که باعث به وجود آمدن پلاسموسیت (Plasma Cell) می شوند و مسئول ایجاد آنتی کورها (Antibody) و ایمنی هومورال هستند. پاسخهای ایمنی به دو گروه کلی تقسیم می شوند:

دسته اول پاسخهایی است که بر مبنای تولید ایمونوگلبولینها از لنفوسیتهای B شکل می گیرند (ایمنی هومورال) و دسته دوم شامل پاسخهایی است که به کمک گروه دیگری از لنفوسیتها یعنی لنفوسیتهای T ایجاد می شوند (واکشنهای ایمنی سلولی یا ازدیاد حساسیت دیررس). هر دو پاسخ معمولاً همراه هم روی می دهند ولی غالباً یکی از آن دو بر دیگری برتری دارد. باید دانست تنها با برخورد آنتی ژن به لنفوسیت B آنتی بادی تولید نمی شود، بلکه برای این کار همکاری سلول فرعی و لنفوسیتهای T ضروری است.

۲-۲- ایمونوگلبولین ها

ایمونوگلبولینها جزو گلیکوپروتئینها می باشند که ۸۲ تا ۹۶ درصد آن پروتئین و ٤ تا ۱۸ درصد آن کربوهیدرات می باشد. این گلیکوپروتئین ها ۲۵ درصد پروتئینهای پلاسما را تشکیل می دهند

۱-۲-۲ ساختمان آنتی بادی

. ایمونوگلبولینها در مولکول خود دارای دو زنجیره مختلف پلی پپتیدی هستند که عبارتند از: یک جفت زنجیره سنگین (Heavy Chain) که با حرف H نشان می دهند و از بهم پیوستن تعداد بیشتری اسیدآمینه تشکیل شده اند، و یک جفت زنجیره سبک (Light chain) که با حرف L نشان می دهند که از اتصال تعداد کمتری اسید آمینه تشکیل شده اند. مجموعه این ساختار چهار رشته ای در اغلب موجودات وزنی حدود ۱۵۰ کیلو دالتن دارد. هر کدام از این زنجیره ها از دو بخش متغیر V (Variable) و ثابت C (Constant) تشکیل شده اند. بخشی از زنجیره ایمونوگلبولین که با آنتی ژن ترکیب می شود مشتمل است بر N-terminal acid sequences که توالی اولیه آمینواسیدهای این بخش از ملکول ایمونوگلبولین دارای درجه تغییرپذیری بالاست که به آن ناحیه تغییرپذیر V می گویند. نیمه انتهایی دیگر آن (Carboxyl-terminal) که در اتصال آنتی ژن شرکت نمی کند ولی در پدیده هایی چون فعال کردن سیستم کمپلمان، پیوستن به گیرنده های سلولی و عبور از جفت شرکت دارد و اسیدآمینه های این بخش ثابت تر است که به آن ناحیه ثابت C می گویند (شکل ۱-۲). مولکول ایمونوگلبولین به صورت مستقیم نیست بلکه مثلثی شکل است و از سه بخش تشکیل شده که هر بخش از آن بوسیله پیوندهای دی سولفیدی بهم وصل شده و نواحی را تشکیل می دهد که به آن قلمرو (Domain) می گویند. بر این اساس زنجیره سبک حاوی یک قلمرو یا بخش متغیر (VL) و یک بخش ثابت (CL) می باشد و زنجیره سنگین دارای یک بخش متغیر (VH) و بسته به کلاس آنتی بادی دارای ۳ تا ٤ بخش ثابت (CH_4, CH_3, CH_2, CH_1) می باشد. بخش متغیر در هر رشته از ٤ منطقه داربستی FR (Framework