بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

همسانه سازی ژن اینترفرون گامای انسانی و بررسی امکان انتقال آن به گیاه

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

نگارش : نازنین ابراهیمی

استاد راهنما : حمیدرجبی معماری

اساتید مشاور

محمد علی ابراهیمی محمد رعایایی

مهرماه ۱۳۸۹

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان و

به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

سپاسنامه

سپاس یگانه یزدان پاک را که لطف بی دریغ خود را به ذره ای از وجود خویش معطوف ساخت تا او را به روشنایی و زیبایی بگرداند. همه خوبی از اوست و هیچ جز او نیست.

اکنون که به یاری خداوند این پایان نامه را به اتمام می رسانم، بر خود واجب می دانم از زحمات و راهنمایی های استاد گرانقدرم، جناب آقای دکتر معماری که با بردباری و شکیبی بدیل گام هایم به سوی پژوهش و اندیشیدن بودند، سپاسگزاری نمایم.

از اساتید فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر ابراهیمی و جناب آقای دکتر رعایایی که راهنما و راه گشای من در اتمام و اکمال پایان نامه بودند و همواره از مساعدت های بی شائبه ایشان بهره برده ام، تشکر و قدردانی می نمایم.

از جناب آقای دکتر بخشی خانیکی داور محترم این پایان نامه کمال سپاسگزاری را دارم.

خالصانه ترین سپاس ها را پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم، آنان که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم. همچنین از برادر و خواهر عزیزم که همواره مایه دلگرمی ام بوده اند، سپاسگزارم.

ممنون و سپاسگزار محبت های خالصانه دوستان خوبم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز که همواره در طی این تحقیق با ارائه نقطه نظرات ارزشمندشان مرا یاری نموده اند، می باشم.

در انتها تشکر و قدردانی خود را تقدیم می کنم به همه کسانی که مرا از کودکی کلماتی آموخته اند و آنهایی که تا آخرین لحظه زندگی ام مرا خواهند آموخت.

نازنین ابراهیمی

مهرماه ۱۳۸۹

چکیده

امروزه تقاضای زیادی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی جهت درمان و تشخیص وجود دارد. اینترفرون گاما نیز به عنوان یکی از این پروتئین‌های ارزشمند، وسیله دفاعی بدن در مقابل ویروس‌ها می‌باشد و ارزش درمانی بالایی دارد، از این رو به عنوان دارو برای آلودگی های ویروسی، سرطان ها و بیماری های خودایمن مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش آغازگرهای مناسب با توجه به توالی های افزایش دهنده بیان گیاهی، توالی های دو طرف ژن اینترفرون گاما، محل های برش مناسب، توالی His Tag جهت شناسایی و تخلیص پروتئین و فاکتور هگزا جهت حذف His Tag طراحی و برای تکثیر ژن استفاده شد. ژن مورد نظر در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 تحت کنترل پیشبرنده CaMV35S و خاتمه دهنده NOS همسانه‌سازی شد. سازه بدست آمده (pCAMIFN-γ) با روش شوک حرارتی به باکتری اشریشیاکلی سویه DH5α منتقل شده و باکتری های تراریخته بر روی محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین ۵۰ میلی گرم در لیتر انتخاب شدند. با استفاده از تکنیک‌های مختلف colony PCR، هضم آنزیمی، توالی یابی و هم ردیف سازی آن در بانک اطلاعاتی حضور ژن اینترفرون گاما در ناقل بیانی تایید شد. سپس سازه مورد نظر با روش استاندارد انجماد و ذوب به باکتری اگروباکتریوم سویه LBA4404 منتقل شده و برای تراریختی گیاه گوجه‌فرنگی(رقم Cal J) از طریق ریزنمونه های کوتیلدونی و به روش دیسک برگی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تلقیح در ابتدا ریزنمونه ها به مدت ۴۸ ساعت بر روی محیط پیش-کشت قرار گرفته، سپس مایه زنی با اگروباکتریوم انجام شده و ریزنمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۸ درجه بر روی محیط هم-کشت قرار گرفتند. در نهایت ریزنمونه های تلقیح شده به محیط کشت انتخابی که شامل محیط هم-کشت به همراه آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی گرم در لیتر و هیگرومایسین ۷/۵ میلی گرم در لیتر منتقل شدند و در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد قرار گرفتند. بعد از باززایی، استخراج DNA ژنومی گیاه تراریخت انجام شده و با استفاده از تکنیک PCR حضور ژن اینترفرون گاما در گیاه تراریخت تایید گردید.

واژه های کلیدی: پروتئین نوترکیب، اینترفرون گاما، گیاه گوجه‌فرنگی، انتقال ژن، اگروباکتریوم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱مقدمه..... ۲

۱-۱-۱ اینترفرون ها..... ۲

۱-۱-۲ کشاورزی مولکولی..... ۲

۱-۲ اهداف تحقیق..... ۴

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱ پروتئین های نوترکیب..... ۶

۲-۱-۱ سیستم های تولید پروتئین های نوترکیب..... ۶

۲-۲ کشاورزی مولکولی..... ۷

۲-۳ انواع پروتئین‌های تولیدی در کشاورزی مولکولی..... ۸

۲-۳-۱ پروتئین‌ها و واسطه‌های دارویی..... ۸

۲-۳-۲ پروتئین‌های صنعتی(آنزیم ها)..... ۸

۲-۳-۳ آنتی‌بادی‌های تک‌دومنی..... ۸

۲-۳-٤ آنتی‌ژن‌ها برای واکسن‌های خوراکی..... ۸

۲-٤ تاریخچه تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاه..... ۹

۲-۵ اینترفرون ها..... ۱۰

۲-۵-۱ فعالیت و نقش اینترفرون ها..... ۱۱

۲-۵-۲ خواص اینترفرون ها..... ۱۲

۲-۵-۳ اینترفرون گامای انسانی(Human Interferon gamma (Hu-IFN-γ)) ۱۲

۲-۵-٤ تاریخچه تولید اینترفرون گامای نوترکیب..... ۱۵

۲-۵-۵ تاریخچه تولید اینترفرون گامای نوترکیب در ایران..... ۱۶

۲-٦ میزبان‌های مهم برای کشاورزی مولکولی ۱۷
۲-۷ گوجه فرنگی ۱۹
۲-۷-۱ جایگاه رده بندی گوجه فرنگی ۱۹
۲-۷-۲ مشخصات گیاه شناسی ۱۹
۲-۷-۳ احتیاجات آب و هوایی ۲۰
۲-۷-٤ استفاده از گوجه فرنگی در کشاورزی مولکولی ۲۰
۲-۸ سیستم های بیانی مختلف برای کشاورزی مولکولی ۲۱
۲-۸-۱ انتقال هسته‌ای پایدار ۲۲
۲-۸-۲ انتقال کلروپلاستی ۲۳
۲-۸-۳ انتقال موقتی ۲۴
۲-۸-٤ کشت‌های سوسپانسیونی ۲۵
۲-۹ انتقال ژن و مهندسی ژنتیک ۲۶
۲-۱۰ روش‌های انتقال ژن به گیاهان ۲۶
۲-۱۰-۱ انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم(Agrobacterium mediated gen transfer) ۲۶
۲-۱۰-۱-۱ باکتری اگروباکتریوم ۲۷
۲-۱۰-۱-۲ اساس انتقال ژن به وسیله اگروباکتریوم ۲۷
۲-۱۰-۱-۳ ناقل‌های انتقال بر اساس پلاسمید Ti ۳۳
۲-۱۰-۱-٤ روش‌های تراریختی با استفاده از اگروباکتریوم ۳۵
۲-۱۰-۲ روش تراریختی با ایجاد خلاء نسبی ۳۷
۲-۱۰-۳ انتقال ژن به وسیله ویروس ۳۷
۲-۱۰-٤ آلودگی ویروسی با استفاده از اگروباکتریوم، (Agroinfection) ۳۸
۲-۱۰-۵ انتقال ژن به گیاهان به طور مستقیم (یا بدون ناقل) ۳۹
۲-۱۰-۵-۱ جذب مستقیم DNA ۳۹
۲-۱۰-۵-۲ انتقال ژن به روش بمباران ذره‌ای ۴۰

۲-۱۰-۵-۳ انتقال ژن با استفاده از الحاق لیپوزوم ۴۰
۲-۱۰-۵-٤ روش ریزتزریقی(Micro injection)..... ۴۱
۲-۱۰-۵-۵ روش درشت‌تزریقی (Macroinjection)..... ۴۲
۲-۱۰-۵-٦ انتقال ژن به وسیله جریان الکتریسیته کنترل شده (Electroporation)..... ۴۲
۲-۱۱ ژن‌های گزینشگر ۴۳
۲-۱۱-۱ گزینشگرهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک..... ۴۳
۲-۱۲ کشت بافت گیاهی..... ۴۴

فصل سوم: مواد و روش کار

۳-۱ بخش مولکولی ۴۷
۳-۱-۱ مواد شیمیایی ۴۷
۳-۱-۲ باکتری‌ها ۴۷
۳-۱-۳ ناقل ۴۸
۳-۱-٤ ژن اینترفرون گامای انسانی..... ۴۸
۳-۱-۵ آغازگرها ۴۹
۳-۱-٦ آنتی بیوتیک‌ها ۴۹
۳-۱-٦-۱ استرپتومایسین..... ۵۰
۳-۱-٦-۲ سفوتاکسیم ۵۰
۳-۱-٦-۳ کانامایسین ۵۰
۳-۱-٦-٤ هیگرومایسین..... ۵۰
۳-۱-۷ محیط کشت ۵۱
۳-۱-۷-۱ محیط کشت باکتریایی..... ۵۱
۳-۱-۷-۲ تهیه استوک (Stock) از کشت باکتری برای نگهداری در دمای ^{o}C ۷۰- ۵۱
۳-۱-۸ الکتروفورز ژل آگارز..... ۵۲
۳-۱-۸-۱ تهیه بافر TBE (5X) ۵۲

۳-۱-۸-۲ تهیه ژل آگارز ۱٪ ۵۲
۳-۱-۸-۳ تهیه بافر نمونه گذاری (Loading dye)..... ۵۳
۳-۱-۸-٤ تهیه محلول Gel Red..... ۵۳
۳-۱-۹ همسانه سازی قطعات DNA در ناقل بیانی pCAMBIA1304 . ..... ۵۳
۳-۱-۹-۱ استخراج پلاسمید..... ۵۳
۳-۱-۹-۲ هضم ناقل بیانی pCAMBIA1304..... ۵۴
۳-۱-۹-۳ تکثیر ژن به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR ۵۵
۳-۱-۹-٤ شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR..... ۵۶
۳-۱-۹-۵ آماده سازی محصول PCR با آنزیم NcoI و آنزیم BstEII ۵۶
۳-۱-۹-٦ خالص سازی قطعات DNA از ژل..... ۵۷
۳-۱-۹-۷ همسانه‌سازی قطعه بریده شده در ناقل ۵۷
۳-۱-۱۰ انتقال ناقل حامل ژن اینترفرون گاما به باکتری *E. Coli*..... ۵۸
۳-۱-۱۰-۱ تهیه سلول‌های مستعد *E. coli*..... ۵۸
۳-۱-۱۰-۲ روش انتقال ناقل به باکتری..... ۵۹
۳-۱-۱۱ تعیین توالی ژن اینترفرون گاما همسانه سازی شده در ناقل ۵۹
۳-۱-۱۲ انتقال ناقل pCAMBIA1304 حامل ژن اینترفرون گاما به اگروباکتریوم..... ۶۰
۳-۱-۱۲-۱ اثبات وجود سازه در باکتری با استفاده از تکنیک Colony PCR..... ۶۰
۳-۲ بخش انتقال ژن و کشت بافت گیاهی..... ۶۱
۳-۲-۱ مواد گیاهی و آماده سازی بذرها ۶۱
۳-۲-۲ محیط کشت گیاهی MS..... ۶۱
۳-۲-۳ تهیه محیط کشت MS(1X)..... ۶۲
۳-۲-٤ محیط گزینشگر ۶۳
۳-۲-۵ هورمون‌های گیاهی ۶۳
۳-۲-۵-۱ هورمون BAP..... ۶۳

۳-۲-۵-۲ هورمون NAA ۶۴
۳-۲-٦ تراریخت نمودن ریز نمونه های کوتیلدونی با استفاده از اگروباکتریوم ۶۴
۳-۲-۷ باززایی گیاهان تراریخت ۶۵
۳-۲-۸ استخراج DNA ژنومی از گیاه گوجه فرنگی ۶۶
۳-۲-۹ بررسی گیاه تراریخت در سطح DNA با استفاده از تکنیک PCR ۶۷

فصل چهارم: نتایج

٤-۱ طراحی آغازگرها ۶۹
٤-۲ نتایج همسانه سازی ۷۰
٤-۲-۱ تکثیر ژن اینترفرون گاما ۷۰
٤-۲-۲ تخلیص ناقل بیانی گیاهی ۷۱
٤-۲-۳ هضم آنزیمی ژن اینترفرون گاما و ناقل بیانی ۷۱
٤-۲-٤ همسانه سازی ژن اینترفرون گاما در ناقل بیانی ۷۲
٤-۲-۵ تأیید همسانه سازی ژن ۷۳
٤-۳ انتقال سازه حاوی ژن (IFN-γ) به اگروباکتریوم ۷۷
٤-۳-۱ تأیید حضور سازه حاوی ژن در اگروباکتریوم ۷۷
٤-٤ انتقال ژن به گیاه گوجه فرنگی ۷۸
٤-٤-۱ آلوده‌سازی ریزنمونه‌های گوجه فرنگی با اگروباکتریوم نوترکیب حاوی ژن ۷۸
٤-٤-۲ رشد جوانه‌های تراریخت در محیط گزینشگر ۷۹
٤-٤-۳ انتقال جوانه های تراریخت شده حاوی INF-γ به شیشه‌های حاوی محیط کشت جدید ۸۰
٤-۵ بررسی گیاهان تراریخت ۸۱
٤-۵-۱ استخراج DNA ۸۱
٤-۵-۲ تایید حضور ژن اینترفرون گاما در گیاه تراریخت ۸۱

فصل پنجم: بحث

۵-۱ بحث ۸۴

۵-۲ پیشنهادات ۸۷

فصل ششم: منابع

منابع ۸۹

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱ میزبان های بیانی برای کشاورزی مولکولی ۱۸
جدول۳-۱ مواد شیمیایی مورد استفاده ۴۷
جدول۳-۲ ترکیبات محیط کشت LB ۵۱
جدول۳-۳ ترکیبات بافر TBE ۵۲
جدول۳-۴ هضم آنزیمی ناقل ۵۴
جدول۳-۵ اجزا مخلوط واکنش PCR ۵۵
جدول۳-۶ برنامه دمایی و زمانی واکنش PCR ۵۶
جدول۳-۷ هضم آنزیمی قطعه حاوی ژن اینترفرون گاما ۵۶
جدول۳-۸ اجزا واکنش اتصال ۵۷
جدول۳-۹ ترکیبات محیط کشت MS ۶۲
جدول۳-۱۰ غلظت آنتی بیوتیک های مورد استفاده در محیط کشت ۶۳
جدول۳-۱۱ ترکیبات بافر استخراج ۶۷

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل۲-۱ ساختار فضایی پروتئین اینترفرون گاما ۱۴
شکل۲-۲ تصویر کلی پلاسمید Ti ۲۹
شکل۲-۳ انتقال T-DNA از اگروباکتریوم به ژنوم سلول گیاهی ۳۲

شکل۳-۱ نقشه ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 ..... ۴۸
شکل۳-۲ توالی ژن اینترفرون گامای انسانی..... ۴۹
شکل۳-۳ توالی پروتئین اینترفرون گامای انسانی..... ۴۹
شکل۴-۱ محصول PCR با آنزیم high fidelity بر روی ژل آگاروز ۱٪..... ۷۰
شکل۴-۲ ناقل تخلیص شده..... ۷۱
شکل۴-۳ واکنش هضم آنزیمی..... ۷۲
شکل۴-۴ سازه بیانی گیاهی pCAMIFN-γ ۷۳
شکل۴-۵ گزینش سلول های تراریخت*E. coli* ۷۳
شکل۴-۶ تأیید حضور ژن اینترفرون گاما در *E. coli* با استفاده از Colony PCR..... ۷۴
شکل۴-۷ نتایج حاصل از هضم آنزیمی pCAMIFN-γ جهت تایید همسانه سازی..... ۷۵
شکل٤-۸ تایید حضور ژن IFN-γ در ناقل بیانیpCAMBIA1304 ..... ۷۵
شکل۴-۹ نتایج حاصل از تعیین توالی ژن اینترفرون گاما..... ۷۶
شکل۴-۱۰ نتایج حاصل از BLAST ژن اینترفرون گاما..... ۷۶
شکل۴-۱۱ گزینش سلول های تراریخته اگروباکتریوم..... ۷۷
شکل۴-۱۲ تایید حضور ژن IFN-γ در اگروباکتریوم با استفاده Colony PCR ۷۸
شکل۴-۱۳ کشت ریزنمونه های تلقیح شده توسط اگروباکتریوم روی محیط هم کشت..... ۷۹
شکل٤-۱٤ پیدایش و رشد جوانه های اولیه از ریز نمونه ها، بر سطح محیط گزینشگر..... ۸۰
شکل٤-۱۵ انتقال گیاهچه‌ها به شیشه‌های بزرگتر حاوی محیط کشت گزینشگر..... ۸۰
شکل۴-۱۶استخراج DNA ژنومی..... ۸۱
شکل۴-۱۷ تایید حضور ژن اینترفرون گاما در ژنوم گیاه تراریخته..... ۸۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

۱-۱-۱ اینترفرون‌ها[1]

اینترفرون‌ها از خانوادهٔ گلیکوپروتئینی سایتوکین‌ها[2] هستند که در سال ۱۹۵۷ کشف شدند. آن‌ها پروتئین‌های القایی می‌باشند که در مقابله با عفونت های ویروسی، انگلی، سرطان ها، بیماری‌های خودایمن و برای کنترل سیستم ایمنی بسیار مؤثر هستند. این عوامل همچنین بر روی تکثیر و تمایز سلولی مؤثر می‌باشند. اینترفرون‌ها وظایف متعدد خود را از طریق تحریک و القاء تولید تعداد زیادی پروتئین انجام می‌دهند(۷۶،۲۵).

فروش جهانی اینترفرون‌ها در سال های اخیر بالغ بر ۴ میلیارد دلار برآورد شده است. با توجه به مصرف زیاد و قیمت بالای این دارو علاقه شدیدی برای تولید اینترفرون‌ها از منابع دائمی، ایمن و ارزان وجود دارد(۱۴).

اینترفرون‌های انسانی در سه گروه اصلی آلفا(a)، بتا(b) و گاما (g) رده بندی می‌شوند. اینترفرون گاما[3] سایتوکین اصلی فعال کننده ماکروفاژ است و عملکردهای مهمی در ایمنی سلولی در مقابل میکروب‌های داخل سلولی دارد. از این پروتئین برای درمان بیماران نقص ایمنی مادرزادی و همچنین آلودگی‌های درون سلولی مانند لیشمانیا[4] (۱۱) و سالمونلا تیفوموریوم[5] (٦١) و نیز درمان سرطان‌های مختلف از جمله نوروبلاستوما[6] (۷۵) و ملانوما[7] (۷) استفاده می‌شود. اینتروفرون گاما همچنین نقش مهمی در پاسخ های التهابی بر عهده دارد. اینترفرون گاما به عنوان درمان کمکی جهت کاهش تکرار و شدت عفونت های همراه با بیماری گرانولوماتوز مزمن و فیبروز ریوی و کاهش پیشرفت بیماری استئوپتروزیس بدخیم به کار می‌رود.

۱-۱-۲ کشاورزی مولکولی[8]

هزاران سال است که بشر از گیاهان به عنوان منبع مواد خام و انواع داروهای گیاهی استفاده می‌کند. همزمان با شکل گیری اولین تمدن ها بشر از عصاره های گیاهی جهت درمان بیماری‌ها و تسکین دردها استفاده کرده است. در اواخر دهه ۸۰ میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در

1-Interferon
2- Cytokine
3-Gamma Interfron
4-*Leishmania*
5-*Salmonella Typhimurium*
6-*Neuroblastoma*
7-*Melanoma*
8-Molecular farming

گیاهان باعث کشف سیستم‌های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین‌های دارویی ارزان و ایمن بودند(۷۷). به تولید داروهای زیستی و پروتئین‌های مهم در گیاهان از طریق تکنیک های مهندسی ژنتیک کشاورزی مولکولی اطلاق می‌شود. کشاورزی مولکولی رویکردی جدید، جهت تولید ترکیبات دارویی بوده و دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود انواع آنتی بادی های نوترکیب، واکسن‌ها، جایگزین های خونی، فاکتورهای رشد و آنزیم‌ها می‌باشد(۳۰).

نیاز فراوان به داروهای بیولوژیکی و قیمت بالای آن‌ها باعث گزینش گیاهان به عنوان بیوراکتورهای طبیعی برای تولید این داروها شده است و پروتئین‌های نوترکیب ارزشمندی را می‌توان از این طریق در مقیاس زیاد و به قیمت ارزان تولید کرد. از فواید و کاربردهای آن می‌توان به اقتصادی تر بودن آن نسبت به سیستم‌های صنعتی، تولید فراورده های بیولوژیکی فعال و مشابه فرم طبیعی، بیان بالای ژن و تولید بالای پروتئین نوترکیب، پایداری بیشتر و همچنین عدم وجود خطرات ناشی از آلودگی با عوامل بیماریزای انسانی مانند HIV [1]، HCV [2] و سموم بالقوه خطرناک اشاره کرد(۹۰).

با این وجود باید توجه کرد که پتانسیل بالای تولید پروتئین‌های دارویی در گیاهان فقط در صورتی محقق می‌شود که تولیدات حاصل، استانداردهای کیفی لازم و همچنین درجه کیفی دارویی را داشته باشند تا بتواند از فیلترهای نظارتی رد شده و استفاده از آنها در آزمایشات بالینی و درمان معمول گردد. برای رسیدن به این اهداف باید تکنولوژی‌های مربوط به بهبود عملکرد از نظر کمی را توسعه داد، از کیفیت و پایداری محصولات مطمئن گردید و همچنین مراحل تخلیص و پردازش فراورده بخوبی انجام گیرد(۸٤).

علاوه بر این مسائل، چندین چالش مهم دیگر وجود دارد که عبارتند از : نگرانی هایی که در مورد مسائل محیطی وجود دارد، موضوعات ایمنی زیستی و ریسک موفقیت کشاورزی مولکولی. این موضوعات بخوبی نشان می‌دهد که اهمیت ایمنی آزاد سازی گیاهان تراریخت کمتر از اهمیت ایمنی خود محصولات نوترکیب تولید شده نیست(۸۱).

1- Human Immunodeficiency Virus
2- Hepatitis C Virus

۱-۲ اهداف تحقیق

با توجه به مزیت‌های سیستم‌های گیاهی نسبت به سایر سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب نظیر مخمر، فاژ، باکتری و سلول‌های پستانداران و همچنین اهمیت و کابرد های فراوان پروتئین اینترفرون گاما در پزشکی، ضرورت تولید این پروتئین از منابع دائمی و ارزان، اجتناب ناپذیر می‌باشد. گیاه گوجه فرنگی به عنوان یک گیاه مناسب از نظر دستورزی ژنتیکی و تکنیک‌های کشت بافت گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجا که تا کنون گزارشی مبنی بر تولید پروتئین اینترفرون گاما در گیاه گوجه فرنگی دریافت نشده است، لذا این تحقیق می‌تواند زمینه تولید آن را در این گیاه، ایجاد نماید.

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱ پروتئین‌های نوترکیب

تولید پروتئین‌های نوترکیب از مهمترین دستاوردهای بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در سال‌های اخیر بوده است. امروزه تقاضای زیادی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی جهت درمان و تشخیص وجود دارد. در حال حاضر حدود ۲۰ پروتئین نوترکیب در بازار وجود دارد که ٦٠٪ فروش آنها مربوط به شش پروتئین داروئی است که عبارتند از: اریتروپویتین، عامل محرک کلونی گرانولوسیت، واکسن هپاتیت B، هورمون رشد انسانی، انسولین و آلفا اینترفرون(٤٤).

۲-۱-۱ سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب

گذشته از نوع پروتئین نوترکیب، دسترسی به سیستم تولیدی ساده و ارزان برای تولید این پروتئین‌ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. برخی از انواع این سیستم‌ها عبارتند از:

۱- رایج ترین سیستم بیانی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، استفاده از سیستم‌های پروکاریوتی است و در این بین ***E.coli*** با توجه به سهولت دستکاری، به صرفه بودن نسبی اقتصادی و سادگی ذاتی بیان پروتئین (فقدان فرایند Splicing) سیستم غالب می باشد اما تولیدات نوترکیب آن ممکن است همراه با اندوتوکسین باشد که استفاده از آن را در شرایط ***in vivo*** دشوار می سازد. ضمن آنکه امکان تخریب پروتئولیتیک پروتئین بیگانه نیز وجود دارد(٤٠). مهمترین اشکال سیستم‌های پروکاریوتی، ناتوانی آنها در انجام تغییرات پس از ترجمه روی پروتئین‌های تولیدی است.

۲- سیستم‌های ساده یوکاریوتی مانند مخمرها نیز می تواند در تولید پروتئین‌های نوترکیب به کار گرفته شوند. عمده ترین اشکال این سیستم‌ها ناتوانی از انجام بعضی از تغییرات پس از ترجمه بخصوص گلیکوزیلاسیون است که بسیار مهم بوده و در مخمر می تواند متفاوت از یوکاریوت‌های عالی تر باشد. به علاوه مقادیر تولید پروتئین نوترکیب در مخمر محدود است و تولید آن در مقیاس وسیع مقرون بصرفه نیست.

۳- تولید پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های پستانداران نیز بخوبی انجام شده است اما تولید گسترده آن گران و وقت گیر است. ضمن آنکه استفاده از این روش خطر آلودگی به عوامل عفونی و ویروس‌های مختلف واگیردار و توالی‌های انکوژن را در پی داشته و از نظر قانونی و اخلاقی نیز محدودیت‌هایی برای آن مطرح می باشد. همچنین طی کشت سلول‌های جانوری کنترل دقیق حالات

کشت برای اطمینان از خلوص محصولات الزامی است، چرا که این سلول‌ها بویژه وقتی در مقیاس صنعتی کشت می شوند، نسبت به تغییرات محیطی بسیار حساسند(٦٦).

٤- گیاهان یکی دیگر از سیستم‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند که می‌توانند به آسانی رشد کرده و توده زنده[1] قابل توجهی تولید کنند. پروتئین‌های حاصل از گیاهان، عاری از اندوتوکسین‌های مضر، عوامل بیماریزای جانوری، پاتوژن های بالقوه انسانی و DNA انکوژن و ویروسی هستند که در سیستم‌های بیانی رایج مانند کشت سلول‌های جانوری و پروکاریوتی احتمال حضورشان وجود دارد و از این جهت نیز مدلی ایده آل برای بیان پروتئین‌های درمانی و تشخیصی می‌باشند(۸۲). از آنجایی که پروتئین‌های بیگانه‌ای که در گیاهان بیان می‌شوند ساختار اصلی خود را حفظ می‌کنند، می‌توان از گیاهان تراریخت برای تولید پروتئین‌ها و پپتیدهایی با ارزش دارویی استفاده کرد(۲۲). پیشرفت‌های منظم در ناقل‌های مورد استفاده، روش های تخلیص و گیاهان مناسب‌تر (برای مثال ارزان‌تر) سبب شده است که استفاده از گیاهان به منظور تولید پروتئین های نوترکیب بیشتر و بیشتر مورد توجه قرار گیرد. بنابراین با توجه به پایداری گیاه تراریخت و DNA الحاقی به آن و امکان افزایش تولید با روش‌های کشاورزی برای تولید نامحدود و ارزان قیمت، گیاهان، اقتصادی‌ترین سیستم برای تولید مقادیر فراوان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند.

۲-۲ کشاورزی مولکولی

کشاورزی مولکولی واژه‌ای به معنای تولید پروتئین‌های با ارزش تجاری و دارویی در گیاهان تراریخته می‌باشد(۴۲). در کشورهای پیشرفته دنیا تلاش پرشتابی جهت تولید زیست داروها از منابع گیاهی انجام می‌گیرد. هم اکنون در آمریکا گیاهان توتون به کارخانه‌های تولید داروهای ضد سرطان تبدیل شده‌اند. از مزارع جو در ایالت واشنگتن تا مزارع نیشکر در هاوایی، دانشمندان آمریکایی محصولات کشاورزی پیشرفته‌ای را تولید می‌کنند که محصولات ارزان تر و راه های موثرتری را برای درمان بیماران با این غذاها فراهم می‌کنند. این کار به مدت بیش از یک دهه است که انجام می‌شود، اما محصولات ذکر شده به تازگی مراحل نهایی فرآوری خود را پشت سر گذاشته‌اند و وارد آزمایشات کلینیکی و فرایند تجاری شده‌اند. بطوری که بیماران در حال حاضر مقادیری از این گیاهان را به عنوان دارو استفاده می‌کنند(۹).

1-biomass