بسم الله الرحمن الرحیم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام

انتقال ژن GFP به سلول های کبدی جوجه با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی نوترکیب

اساتید راهنما
دکتر مسعود علی پناه
دکتر موسی گردانه

اساتید مشاور
دکتر مصطفی یوسف الهی
دکتر مرتضی دلیری

تهیه و تدوین
عباس رحیمی شم‌آبادی

مهر ۱۳۸۹

نهال را باران باید تا بشوید غبار نشسته بر برگهایش و سیرابش کند از آب حیات

و آفتاب باید تا بتاباند نیرو را و محکم کند شاخه های تازه روییده را

به نام مادر

بوسه ای باید زد دست هایی را که می شویند غبار خستگی روزگار را و سیراب می کنند روح تشنه را

به نام پدر

بوسه ای باید زد دست هایی را که می تابانند نیرو را و محکم می کنند استواری پایه های زیستن را

و به نام او که برایم مادر بود و پدر و به نام او که دعاهایش بدرقه راهم بود.

این مجموعه را تقدیم می کنم به روح بلند پدرم

و تقدیم می کنم به مادرم

به پاس عاطفه سرشار وجودش و به پاس قلب بزرگش که سرگردانی و ترس در پناهش به شجاعت تبدیل می شود.

و تقدیم می کنم به خواهران و برادرم

به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

تقدیر و تشکر:

باید اعتراف کرد که با هیچ نوشته و با هیچ زبانی نمی توان شکر تو گفت و از بندگان نیک تو تشکر کرد.

و اما بر حسب وظیفه از کلیه اساتید ارجمند که در طول سالهای تحصیل در زیر سایه دانش و بزرگیشان به کسب علم پرداختیم تشکر می نمایم. از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر علی پناه که مرا شیفته ی بزرگی و متانت خود کرده و در طول مسیر از هدایت ها و تشویق های ایشان بهره بردم. همچنین از استاد گرامی آقای دکتر موسی گردانه که تمام زندگی خود را وقف علم و تحقیق کرده و تلاش و نظم و جدیت در کار را در مسیر راه به من آموخت، خاضعانه سپاسگزارم. همچنین از اساتید عزیز دکتر مصطفی یوسف الهی و دکتر مرتضی دلیری به دلیل همیاتیاشان در مراحل انجام این کار کمال تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین بر خود واجب می دانم از مدیران و همکاران گرامی ام در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بخصوص متخصصین بخش ژنتیک مولکولی که علی رغم مشغله های متعدد با همکاری بسیار خوب و صرف زمان در تکمیل این تحقیق، زحمات زیادی را متقبل شده اند تشکر می نمایم.

و همچنین از آقای علی اکبر رحیم به خاطر حمایت و کمک های بی دریغشان در طول انجام این تحقیق صمیمانه سپاسگزارم.

و یک تشکر ویژه از آقایان مصطفی غلامی و یاسین پناهی و خانمها رویا صافی و سحر شجاعی که در طول مدت انجام این تحقیق از تجربیات و دانش آنها بهره مند شدم را دارم.

و در پایان از مادر عزیزم و برادر و خواهران گرامی و فرشتگانی که بالهای محبت خود را گسترانیدند و با تحمل دشواری ها، سبب شدند تا در کمال آسودگی خیال و فراغت بال، شوق آموختن در من زنده بماند صمیمانه سپاسگزارم.

عباس رحیمی شم آبادی ۱۳۸۹

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- ضرورت انجام تحقیق ۴

۱-۳- اهداف تحقیق ۵

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱ روش های انتقال ژن ۷

۲-۱-۱- ۲- روشهای شیمیایی ۷

۲-۱-۲- روش های فیزیکی ۷

۲-۱-۲-۱- الکتروپوریشن ۸

۲-۱-۲-۲- لیزر پوریشن ۸

۲-۱-۲-۳- ریز تزریقی ۸

۲-۱-۲-۴- تفنگ ذرات ۹

۲-۱-۳- انتقال ژن با وکتورهای ویروسی ۹

۲-۲- وکتورهای ویروسی ۱۱

۲-۲-۱- وکتورهای ویروسی مبتنی بر DNA ۱۱

۲-۲-۱-۱- وکتورهای آدنو ویروس ۱۱

۲-۲-۱-۲- وکتورهای AAV ویروس ۱۲

۲-۲-۱-۳- وکتورهای هرپس ویروس ۱۳

۲-۲-۲-وکتور های ویروسی مبتنی بر RNA ۱۵

۲-۲-۲-۱-وکتورهای رتروویروسی ۱۵

۲-۲-۲-۲- وکتورهای لنتی ویروس ۱۶

۲-۳- روش های ترانسفکشن ۲۱

۲-۳-۱-روش های شیمیایی ترانسفکشن ۲۱

۲-۳-۲- عوامل ترانسفکشن مبتنی بر لیپیدها ۲۲

۲-۳-۳- ترانسفکشن با استفاده از پلیمر های غیر لیپیدی سنتز شده ۲۲

۲-۴- تولید ویروس نوترکیب ۲۳

۲-۵- ناقل های تولید کننده ویروس نوترکیب ۲۴

۲-۵-۱ ناقل غشاء ویروس ۲۴

۲-۵-۲- ناقل بسته بندی ۲۴

۲-۵-۳- ناقل انتقال ژن کاندیدا ۲۵

۲-۶- سیستم های بیان دوژنی ۲۵

۲-۷- سیستم‌های کنترل کننده بیان ژن ۲۸
۲-۷-۱- سیستم های تنظیم بیان ژن مبتنی بر تتراسایکلین ۲۸
۲-۷-۲- بیان تنظیمی ژن مبتنی بر رسپتور هورمون استروئید ۳۱
۲-۷-۳- بیان کنترل شدهی ژن با استفاده از ریپمایسین ۳۲
۲-۷-۴- تنظیم فیزیولوژیکی بیان ژن ۳۲
۲-۸- ژن GFP ۳۳
۲-۹- مشخصات عمومی سلول های LMH ۳۶
۲-۱۰- مشخصات عمومی سلول ها ی HEK293T ۳۶
۲-۱۱- تحقیقات انجام شده ۳۷

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ تجهیزات ۴۲
۳-۱-۱ دستگاه های آزمایشگاهی و ابزار (بخش مولکولی) ۴۲
۳-۱-۲- دستگاه های آزمایشگاهی و ابزار (بخش سلولی) ۴۳
۳-۲- مواد مورد نیاز برای بخش مولکولی ۴۵
۳-۲-۱- سویه های باکتریایی ۴۵
۳-۲-۲- ناقل های پلاسمیدی ۴۵
۳-۲-۳- آنتی بیوتیک ها ۴۷
۳-۲-۴- محیط کشت باکتری ۴۷
۳-۲-۴-۱- محیط کشت مایعLB ۴۷
۳-۲-۴-۲- محیط کشت LB جامد ۴۷
۳-۲-۵- آنزیم‌های مورد استفاده ۴۹
۳-۲-۶- نشانگرهای وزن مولکولی ۵۰
۳-۳- محلول ها و بافرها ۵۱
۳-۳-۱- بافر کراکینگ ۵۱
۳-۳-۲- بافر TAE ۵۱
۳-۳-۳- محلول رنگ آمیزی ۵۲
۳-۳-۴- محلول‌های مورد نیاز برای استخراج DNA پلاسمیدی در مقیاس کم به روش لیز قلیائی ۵۳
۳-۳-۵- محلول‌های مورد نیاز برای تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد ۵۴
۳-۳-۶- کیت‌های آزمایشگاهی مورد استفاده در بخش مولکولی ۵۴
۳-۴- مواد بخش سلولی ۵۵
۳-۴-۱ رده های سلولی ۵۵
۳-۴-۲- محیط های کشت سلولی ۵۵
۳-۴-۳- سرم جنین گاوی ۵۵
۳-۴-۴- ژلاتین ۵۵
۳-۴-۵- پودر HEPES ۵۶
۳-۴-۶ رنگ تریپان بلو ۵۶
۳-۴-۷- تریپسین EDTA ۵۶
۳-۴-۸-DMSO ۵۶
۳-۴-۹ پنی سیلیتن- استرپتومایسین ۵۶

۳-۵- بافرها و محلول ها ی کشت سلول ۵۷
۳-۵-۱- بافر PBS ۵۷
۳-۵-۲- بافر HBS ۵۷
۳-۵-۳- محلول تریپسین(۰/۲۵٪)/EDTA 0.5mM ۵۸
۳-۵-۴- ژلاتین 0.1% ۵۸
۳-۵-۵- محلول رنگ تریپان بلو ۵۸
۳-۵-۶- محیط کشت DMEM ۵۸
۳-۵-۷- محیط کشت Waymouth ۵۹
۳-۵-۸- داکسی سایکلین ۵۹
۳-۶ روش‌های بخش مولکولی ۶۰
۳-۶-۱- مستعد سازی باکتری‌ها ۶۰
۳-۶-۲- واکنش‌های هضمی ۶۱
۳-۶-۳- استخراج قطعات هدف از ژل آگاروز ۶۳
۳-۶-۴- واکنش اتصال ۶۳
۳-۶-۵- ترانسفورم کردن باکتریها ۶۴
۳-۶-۶- کرکینگ ۶۴
۳-۶-۷- تخلیص پلاسمید به روش لیز قلیائی ۶۵
۳-۶-۸- تهیه ذخیره گلیسرول ۶۶
۳-۶-۹- تهیه DNA پلاسمید در مقیاس بالا ۶۶
۳-۷- روش‌های بخش سلولی ۶۷
۳-۷-۱- ذوب کردن و کشت سلول ۶۷
۳-۷-۲- پاساژ سلول ۶۷
۳-۷-۳- شمارش سلول ۶۸
۳-۷-۴- فریز کردن سلول ها ۶۹
۳-۷-۵- تهیه ژلاتین ۰٫۱٪ ۷۰
۳-۷-۶- ژلاتینه کردن کف فلاسک و پلیت کشت سلول ۷۰
۳-۷-۷- ترانسفکشن سلولها و تولید ویروس نوترکیب ۷۰
۳-۷-۸- تغلیظ ویروس نوترکیب ۷۲
۳-۷-۹- آلوده سازی سلول ها با وکتورهای ویروسی نوترکیب ۷۲

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ نتایج هضم آنزیمی وکتور ناقل و وکتور بیانی لنتی ویروس ۷۴
۴-۱-۱- تهیه DNA وکتور های بیانی و وکتور ناقل در مقیاس بالا ۷۴
۴-۱-۲- هضم آنزیمی وکتور بیانی لنتی ویروس و وکتور ناقل قطعه هدف ۷۴
۴-۱-۳- برش قطعات هدف از روی ژل و بازیافت قطعات هدف و قطعه وکتور ۷۵
۴-۲- نتایج حاصل از قربالگری کلونی های انتخاب شده ۷۷
۴-۲-۱ کرکینگ کلونی‌های حاصل از واکنش اتصال بین قطعه هدف و وکتور بیانی لنتی ویروس ۷۷
۴-۲-۲- پلاسمید های تهیه شده در مقیاس کم از کلونی‌های انتخاب شده ۷۸
۴-۲-۳-آزمون صحت کلونی ها با استفاده از هضم انزیمی Kpn1 ..... ۷۹
۴-۲-۴-آزمون صحت کلون با آنزیم های Sfi1/BamH1 ..... ۸۰

۵-۲-۴-آزمون صحت کلون با آنزیم Xho1 ..... ۸۱
۳-۴- نتایج مطالعات سلولی..... ۸۳
۱-۳-۴-آزمون عملکرد سازه..... ۸۳
۲-۳-۴-کشت سلول های LMH ۸۵
۳-۳-۴- ترانسفکشن سلول های کبدی جوجه..... ۸۶
۴-۳-۴- آلوده سازی سلول‌های کبدی جوجه با ویروس نوترکیب..... ۸۷
۵-۳-۴- مقایسه میزان ترانسفکشن سلول‌های LMH با سلول‌های استاندارد HEK ۸۸
۶-۳-۴- مقایسه میزان ترانسداکشن رده سلول‌های LMH با سلول‌های..... ۸۹
۷-۳-۴- بیان القائی ژن GFP در سلول‌های کبدی جوجه..... ۹۰
۴-۴- بحث..... ۹۴
۵-۴- پیشنهادات..... ۱۰۱
منابع..... ۱۰۳

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۲- ویژگی‌های ژنتیکی ناقل لنتی ویروسی مشتق از HIV-1 ..... ۲۰
جدول ۱-۳- ترکیبات محیط کشتLB مایع و جامد..... ۴۸
جدول ۲-۳- اسامی آنزیم های محدودالاثر به همراه غلظت و نام شرکت سازنده آن‌ها..... ۴۹
جدول ۳-۳- اسامی و مشخصات سایرآنزیم‌های استفاده شده در این تحقیق ۴۹
جدول ۴-۳- ترکیبات بافر کرکینگ..... ۵۱
جدول ۵-۳- ترکیبات 50 X TAE Stock buffer..... ۵۲
جدول ۶-۳- مواد لازم برای تهیه ترکیب A در عملیات ترانسفکشن..... ۷۱

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل۲-۲- شمایی از ویروس آدنو ویروس ۱۲
شکل۳-۲- شمایی از AAV را به نمایش گذاشته است..... ۱۳
شکل۴-۲- شمایی از ساختار و اجزاء تشکیل دهنده هرپس ویروس را نشان می‌دهد..... ۱۴
شکل ۵-۲- شمایی از ژنوم و ساختار ویروس طبیعی ۱۶
شکل ۶-۲- شمایی از مراحل تولید ویروس ۲۳
شکل ۷-۲- شمایی از طرز کار سیستم های IRES و 2A ۲۷
شکل ۸-۲- شمایی از سیستم های القاعی Tet on و Tet off..... ۳۰
شکل ۹-۲- شمایی از ساختار پروتئین فلوروسنس و فتوپروتئین ایکورین به ترتیب از چپ به راست..... ۳۵
شکل۱۰-۲- شمایی از فرایند تولید نور فلوروسنس در حالت طبیعی..... ۳۵
شکل ۱-۳- شمایی از وکتور ناقل قطعه هدف و وکتورهای ویروسی..... ۴۶
شکل ۲-۳- شمایی از نشانگر ۱ کیلوبازی ۵۰
شکل۳-۳- شمایی از بخش مشخص شده برای شمارش سلول در لام هموسایتیومتر..... ۶۹
تصویر۱-۴- هضم آنزیمی وکتور بیانی و وکتور ناقل قطعه هدف با استفاده از آنزیم‌های مورد نظر..... ۷۵
تصور۲-۴- قطعات هدف و صحت اندازه آنها بعد از بازیافت آنها از ژل ۷۶
تصور۳-۴- نتایج غربالگری کلونی‌های کرکینگ شده..... ۷۷
تصور۴-۴- نتایج پلاسمیدهای تهیه شده در مقیاس کم از کلونی‌ها..... ۷۸
تصویر۵-۴- نتیجه هضم با آنزیم Kpn1 بیانگر صحت کلونی شماره ۵ و ۳۵ می باشد..... ۷۹
تصویر۶-۴- نتایج هضم آنزیمی با آنزیم های Sfi1/BamH1..... ۸۰
تصویر۷-۴- تست صحت کلون را با آنزیم Xho1..... ۸۱
شکل ۸-۴- شمای کلی از روند تولید سازه تولید شده و شمای خطی سازه با نواحی هضم آنزیمی..... ۸۲
تصویر۹-۴- آزمون صحت عملکرد سازه در سطح ترانسفکشن و اینفکشن در سلول‌های HEK..... ۸۴
تصویر۱۰-۴- شمایی از سلول های کبدی جوجه، آماده برای آزمایش های سلولی..... ۸۵
تصویر۱۱-۴- بیان گذرای ژن هدف پس از ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن در سلول‌های LMH ۸۶
تصویر۱۲-۴- بیان دائم ژن هدف در سلول‌های LMH ۷۲ ساعت بعد از آلوده سازی با ویروس نوترکیب ۸۸
تصویر۱۳-۴- بیان القایی ژن GFP در سلول‌های LMH ۹۲

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۱-۲- مقایسه آماری دو روش میکرواینجکشن و وکتورهای لنتی ویروسی در بیان و القاء ژن.....۱۱
نمودار ۱- ۴- مقایسه قابلیت ترانسفکشن دو لاین سلولی بعد از ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت ۸۹
نمودار ۲- ۴- مقایسه قابلیت ترانسداکشن یا آلوده شدن دو لاین سلولی با ویروس نوترکیب.....۹۰
نمودار ۳-۴- بیان القایی ژن گزارشگر GFP تحت تاثیر القاگر داکسی سایکلین.....۹۳

چکیده

امروزه پرنده‌ها به عنوان بیوراکتورهای تولید کننده پروتئین‌های دارویی مورد توجه خاص محققان قرار گرفته‌اند، چرا که پرنده‌ها دارای فاصله نسلی کوتاهتری بوده و تولید طیور تراریخته سریع‌تر و ارزانتر انجام می‌پذیرد. اما به دلیل سیستم تولید مثلی متفاوت در پرندگان یکی از ابزارهای موثر و پرکاربرد برای تولید پرندگان ترانس‌ژن، وکتورهای ویروسی می‌باشند. وکتورهای ویروسی به دلیل توانایی بالای آنها در الحاق ژن به ژنوم سلول‌های میزبان مورد توجه دانشمندان بوده. در بین وکتورهای ویروسی، سیستم‌های لنتی ویروسی یکی از قوی‌ترین و پرکاربردترین وکتورها می باشند. در این مطالعه، ژن گزارشگر GFP از روی وکتور ناقل برداشته شد و در وکتور بیانی لنتی ویروسی کلون گردید و بعد از تولید ویروس نوترکیب ناقل ژن هدف، کشت سلول‌های کبدی جوجه با ویروس نوترکیب آلوده شد و بعد ۴۸ ساعت بیان ژن گزارشگر در کشت سلول‌های کبدی جوجه در زیر میکروسکوپ فلوروسنت مشاهده شد. همچنین، در این تحقیق بیان کنترل شده ژن گزارشگر GFP با استفاده از سیستم‌های القایی لنتی ویروسی مورد ارزیابی قرار گرفت. این تحقیق می‌تواند گام مقدماتی در راستای تولید پرنده‌های ترانس‌ژن با استفاده از وکتورهای ویروسی محسوب گردد و ادامه این تحقیقات و تکرار آن در رده سلول‌های پایه‌ای جوجه و در نهایت تیمار بلاستودروم و جنین جوجه با ویروس‌های نوترکیب می‌تواند نتایج خوبی را برای رسیدن به هدف تولید پرنده‌های تراریخته به ارمغان آورد.

کلمات کلیدی: انتقال ژن، تراریخته، وکتور ویروسی، لنتی ویروس، کشت سلول

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

پروتئین‌های دارویی یکی از گران‌ترین و مهمترین محصولاتی است که بشر توانسته است از راه هایی غیر از روش طبیعی آنها را سنتز کند. در دنیای امروز تقاضا برای داروهای زیستی روز به روز در حال افزایش می‌باشد و چون معمولاً قیمت این داروها، فراوانی آنها را محدود می‌کند لازم است سیستم‌هایی توسعه یابند که بتوانند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند. دانشمندان در تلاش هستند با ایجاد مدل‌های تراریخته، این داروها را از راه-های مختلف تولید کنند. از آنجایی که یک ژن در سیستم‌های مختلف بیان می‌کردد بنابراین، یافتن یک سیستم با کارایی بالا و ایمنی زیستی بالا امری ضروری می‌باشد. از جمله سیستم‌های ایجاد شده برای تولید پروتئین‌های داروی به سنتز پروتئین‌های نوترکیب از طریق باکتری‌ها، مخمرها، انتقال ژن به گیاهان و حیوانات اشاره کرد. سیستم‌های رایج تولید پروتئین مانند استفاده از روش‌های فرمانتاسیون باکتریایی و سیستم‌های مخمری دارای عملکرد و کیفیت پایین می‌باشند و جوابگوی تقاضای رو به افزایش بازار برای داروهای زیستی نمی‌باشد(شریفی‌تبار و همکاران ۱۳۸۷). افزایش حجم و میزان باکتری‌های نوترکیب برای تولید بیشتر پروتئین‌های دارویی می-تواند امنیت زیستی بشر را به مخاطره اندازد و همچنین استفاده از باکتری‌ها و قارچ ها امکان آلودگی محصول به پاتوژن‌های بیماری زای انسانی را افزایش می‌دهد(Bakhshandeh, 2006). تغییر ساختار پروتئین به خاطر فرآیند پردازش و بسته بندی متفاوت بعد از ترجمه ژن هدف از دیگر مشکلات اساسی این سیستم‌ها می‌باشد که این امر به خاطر تفاوت در ساختار سلول‌های یوکاروتی و پروکاریوتی است (Danil *et al*., 2001). سیستم‌های گیاهی می‌توانند روش مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب باشند اما مشکل تفاوت فرایند گلیکوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و

بسته بندی پروتئین‌ها بعد از ترجمه و امکان آلودگی با عوامل بیماری زای جدید مانند قارچ‌ها و باکتری‌های موجود در خاک، در گیاهان نیز وجود دارد(Bakhshandeh, 2006). در حالی که در سیستم‌های حیوانی، پروتئین نوترکیب تولید شده شباهت زیادی به پروتئین طبیعی تولید شده در بدن انسان دارند. علاوه بر مزیت یاد شده سیستم‌های حیوانی خطری برای امنیت زیستی ایجاد نمی‌کند، امکان تولید انبوه پروتئین نوترکیب وجود دارد و در این سیستم خطرات ناشی از پاتوژن-های عامل بیماری انسان و یا سموم بالقوه خطرناک کاهش یافته است(Bakhshandeh, 2006). برخی شرکت‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از سیستم‌های فرمانتاسیون[1] سلول‌های پستاندار استفاده می‌کنند. این سیستم‌ها می‌توانند پروتئین‌های نوترکیبی، کاملاً مشابه با نوع طبیعی آن تولید کنند. با این وجود، این سیستم‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند. صرف زمان زیاد برای به دست آوردن کلون بیان کننده ژن هدف با بیان دائم. و همچنین صرف هزینه زیاد برای به دست آورن هر گرم پروتئین نوترکیب به طوری که هزینه هرگرم از پروتئین نوترکیب معادل ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ دلار می باشد(Biopharm International, 2006). تولید حیوانات تراریخته به عنوان یک بیوراکتور برای تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند راه حلی برای محدودیت‌های سیستم‌های فرمانتاسیون سلول‌های یوکاریوتی باشد. تاکنون حیوانات تراریخته زیادی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و استخراج پروتئین‌های دارویی از فراورده‌های آنها تولید شده است. در بین موجودات، پرندگان می‌توانند به عنوان بیوراکتورهای مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب باشند(Boe *et al.*, 2004). چرا که تولید پرندگان ترانس‌ژنیک به خاطر فاصله‌ی کوتاهتر نسل، در مدت زمان کوتاهتر و صرف هزینه کمتری انجام پذیر است. بنابراین، طیور یکی از گزینه‌های مناسب برای تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب می‌باشد. از ویژگی‌های مناسب دیگر طیور، تولید تخم می‌باشد که می‌تواند وسیله‌ای مناسب برای ذخیره پروتئین‌های دارویی بیان شده باشد، چرا که حجم بسیار بالایی از پروتئین که حدود ۱/۵ گرم می‌باشد به صورت کاملاً استریل درون تخم مرغ بسته بندی

1-Fermentation

می‌شود و تولید آن نیز بسیار ارزان می‌باشد (Simone *et al.*, 2004). روش‌های مختلفی برای انتقال ژن و تولید حیوانات تراریخته وجود دارد، اما همه‌ی روش‌های انتقال ژن در تولید پرنده‌ها و حیوانات تراریخته کارا نیستند. از جمله روش‌های انتقال ژن می‌توان به روش‌های شیمیایی مانند فسفات-کلسیم، روش‌های فیزیکی مانند میکرواینجکشن و روش‌های استفاده از وکتورهای ویروسی مانند وکتورهای آدنوویروسی و لنتی ویروسی را نام برد. روش‌های فیزیکی مانند روش میکرواینجکشن در طیور قابل انجام نمی باشد، چرا که شروع تقسیمات در سلول تخم قبل از خارج شدن تخم از لوله رحمی می‌باشد و بعد از خروج تخم از لوله رحمی تعداد سلول‌ها در بلاستوسیت به حدود ۶۰۰۰۰ سلول می‌رسد (Kristin *et al*., 2008). روشی که اخیراً برای انتقال ژن و تولید حیوانات و پرندگان تراریخته استفاده می‌گیرد استفاده از وکتورهای ویروسی از جمله لنتی ویروس‌ها می باشد. ویروس‌ها به طور طبیعی توانایی بالایی در انتقال و الحاق ژنوم خود در ژنوم سلول میزبان را دارند(Houdebine, 2003; Walther**,** 2000). افزایش اطلاعات در مورد چرخه زندگی ویروس‌ها باعث شده است تا با حذف و جایگزینی برخی از ژن‌های ویروسی و قرار دادن ژن هدف در ساختار ژنتیکی آنها ویروس‌های نوترکیبی را ایجاد کرد که برای اهداف انتقال ژن استفاده شود. (Blomer *et al.*, 2002) برای افزایش ایمنی کار با وکتورهای ویروسی علاوه بر حذف برخی ژن‌های اصلی و سازنده پروتئین‌های ساختاری ویروس به صورت جداگانه توسط ناقل‌های کمک کننده تامین می‌شود و برای بسته‌بندی ویروس از سلول‌های بسته‌بندی کننده استفاده می‌شود که این امر ایمنی کار با این وکتورهای ویروسی را بالاتر می‌برد. در بین وکتورهای ویروسی لنتی ویروس‌ها دارای کارایی بالاتری نسبت به سایر وکتورهای ویروسی می‌باشند زیرا که ۱) قدرت الحاق کنندگی بالا و بیان پایدار ژن مورد نظر در ترکیبDNA سلول‌های هدف (Sven *et al.*, 2009). ۲) امکان درج قطعه جدید هم در سلول‌های بالغ و هم در سلول‌های در حال تقسیم(Rinhard, 2004; Kuate., 2004). ۳) عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته و بیان خالص ژن

کد کننده پروتئین و تولید پروتئین دارویی خالص به خاطر عدم وجود هیچگونه قطعه کد کننده پروتئین های ویروسی در ویروس نوترکیب (Wolkowicz and Nolan 2003; Naldini *et al.*, 1996). ۴) امنیت زیستی بالا به خاطر حذف تمام قطعه های بیماری زای ویروس (Zeger, 2003). ۵) قدرت انتقال قطعه‌های بزرکتر (D.Flip, 2003). ۶) تولید ویروس نوترکیب در مدت زمان بسیار کوتاه. با توجه به این ویژگی‌ها وکتورهای لنتی ویروسی می‌توانند ابزار مناسبی برای انتقال ژن، ژن درمانی و تولید حیوانات نوترکیب باشند.

کشت سلول و انتقال ژن در کشت‌های سلولی از روش‌های مطالعات سلولی و بیولوژیکی بوده و گام اولیه برای تولیدات بیولوژیکی مانند پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از انتقال DNA نوترکیب و همچنین گام نخست برای ژن درمانی و تولید حیوانات ترانس ژن می‌باشد. سلول‌های کبدی جوجه اولین لاین سلولی مخاطی تثبیت شده از پرنده‌های اهلی می‌باشد(Binder *et al.*, 1990). این لاین سلولی در سال ۱۹۸۱ توسط تومویوکی‌کیتاگاوا[1] از سلول‌های سرطانی کبد جوجه‌های نر نژاد لگهورن جدا شد. با انتقال ژن در سلول‌های کبدی جوجه با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی می‌توان علاوه برمطالعه انتقال ژن در این سلول‌ها، میزان آلوده شدن این سلول‌ها با ویروس‌های نوترکیب و دریافت ژن هدف را در این لاین سلولی مطالعه کرد. این مطالعه می‌تواند گامی به سوی به کارگیری وکتورهای ویروسی نوترکیب در تولید مدل‌های تراریخته از پرندگان در ایران باشد.

[1]- Tomoyuki Kitagawa

۲-۱- ضرورت انجام تحقیق

با توجه به اهمیت پروتئین‌های نوترکیب در زمینه پزشکی و درمان بیماری‌های خاص و تمرکز و توجه خاص محققان در زمینه‌ی تولید پروتئین‌های نوترکیب و همچنین، توجه دانشمندان به حیوانات اهلی به عنوان بیوراکتورهای تولید کننده این پروتئین‌های دارویی و جایگاه مهم پرنده های اهلی به عنوان بیوراکتور و توجه به حوزه انتقال ژن در کشت‌های سلولی و بافت‌های خاص در پرندگان و تولید پرنده‌های ترانس‌ژنیک بسیار مهم می‌باشد و اهمیت توجه به این حوزه از ژنتیک را چند برابر می‌کند. با وجود تحقیقات فراوان کشورهای اروپایی در این زمینه هنوز در ایران توجه کمی به این بخش از ژنتیک شده است. با توجه به اهمیت موضوع تولید پروتئین‌های دارویی و تولید پرنده‌های ناقل ژنهای خارجی و تولید کننده پروتئین‌های نوترکیب، تحقیق و بررسی در این زمینه بسیار ضروری می‌باشد. همچنین با توجه به اهمیت وکتورهای لنتی ویروسی در زمینه‌ی انتقال ژن و ژن درمانی و قدرت بالای این وکتورها در الحاق ژن‌های خارجی در طیف وسیعی از سلول‌های پستانداران مطالعه ی میزان الحاق ژن خارجی در کشت‌های سلولی و بافت‌های پرندگان اهلی به وسیله این وکتورها حائز اهمیت می‌باشد.

۳-۱- اهداف تحقیق

هدف از این مطالعه استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی نوترکیب به عنوان ناقلین ژن خارجی به سلول‌های پرنده و ارزیابی وکتورهای ویروسی مبتنی به HIV-1 [۱] به عنوان یک ناقل ژن در کشت‌های سلولی پرنده‌گان و به کارگیری این ناقلین ژن در الحاق ژن خارجی در کشت‌های سلولی پرندگان به عنوان مطالعات اولیه و گامی کوچک در زمینه ی تحقیق و تولید پرنده‌های تراریخته و بررسی بیان القایی ژن گزارشگرGFP [۲] با استفاده از سیستم القایی مبتنی بر

[1]- Human immunodeficiency virus
[2]- green florescence protein

تتراسایکلین که در ناقلین لنتی ویروسی قرار گرفته شده‌اند، و همچنین، بررسی بیان القایی GFP در سلول‌های کبدی جوجه می‌باشد.

فصل دوم

مروری بر منابع