بسم الله الرحمن الرحيم

	اظهار نامه دانشجو	شماره: تاریخ:

اینجانب حسین ملکی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته‌ی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده علوم کشاورزی گواهی می‌دهم که پایان‌نامه تدوین شده حاضر با عنوان؛ "تولید پروتئین کایمریک Tir: EspA از *E. coli*O157H7 در گیاه توتون تراریخت" به راهنمایی اساتید محترم جناب آقای دکتر علاءالدین کردنائیج و علی هاتف سلمانیان توسط شخص اینجانب انجام و صحت و اصالت مطالب تدوین شده در آن، مورد تائید است و چنان چه هر زمان، دانشگاه کسب اطلاع کند که گزارش پایان نامه حاضر صحت و اصالت لازم را نداشته، دانشگاه حق دارد، مدرک تحصیلی اینجانب را مسترد و ابطال نماید همچنین اعلام می‌دارد در صورت بهره‌گیری از منابع مختلف شامل گزارش‌های تحقیقاتی، رساله، پایان‌نامه، کتاب، مقالات تخصصی و غیره، به منبع مورد استفاده و پدید آورنده‌ی آن به طور دقیق ارجاع داده شده و نیز مطالب مندرج در پایان‌نامه حاضر تا کنون برای دریافت هیچ گونه مدرک و امتیازی توسط اینجانب یا سایر افرادبه هیچ کجا ارائه نشده است. در تدوین متن پایان‌نامه حاضر، چارچوب (فرمت) مصوب تدوین گزارش‌های پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشگاه شاهد به طور کامل مراعات شده و نهایتاً اینکه، کلیه حقوق مادی ناشی از گزارش پاین‌نامه حاضر، متعلق به دانشگاه شاهد می‌باشد.

نام ونام خانوادگی دانشجو(دست نویس):

امضاء دانشجو:

تاریخ:

دانشکده علوم کشاورزی

تولید پروتئین کایمریک Tir: EspA از *E. coli*O157H7 در گیاه توتون تراریخت

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

حسین ملکی

اساتید راهنما:

دکتر علاالدین کردنائیج

دکتر علی هاتف سلمانیان

اساتید مشاور:

دکتر جعفر امانی

دکتر امیر محمد ناجی

۱۳۹۱

بسمه تعالی

دانشگاه شاهد
دانشکده علوم کشاورزی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

آقای **حسین ملکی** **به شماره دانشجوئی: ۸۹۷۶۱۸۰۰۳**

تحت عنوان: تولید پروتئین کایمریک EspATir از E.Coli0157H7 در گیاه توتون تراریخت

در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۰۷ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی وتصویب نهائی قرار گرفت که توسط هیئت داوران شایسته ی درجه عالی تشخیص داده شد.

اعضای هیات داوران	مرتبه دانشگاهی	تخصص	امضاء
استاد / اساتید راهنما :			
۱- دکتر علاءالدین کرد نائیج	استادیار		
۲- دکتر علی هاتف سلمانیان	استادیار		
استاد / اساتید مشاور:			
۱- دکتر امیر محمد ناجی	استادیار		
۲- دکتر جعفر امانی	استادیار		
استادان یا محققان مدعو:			
۱- دکتر کسری اصفهانی	استادیار		
۲- دکتر آیت اله رضایی	استادیار		

نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده : آیت اله سعیدی زاده

با تشکر و قدردانی از مسئولین پژوهشگاه ملی مندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری که همه‌ی امکانات لازم را جهت انجام این پایان نامه در اختیار اینجانب قرار دادند.

تقدیم به

مادر مهربان و پدر صبورم

فهرست مطالب

چکیده ۱

فصل اول ۲

۱-۱ کشاورزی مولکولی ۳

۱-۲ سیستم‌های بیانی غیر گیاهی پروتئین‌های نوترکیب ۴

۱-۲-۱ باکتری‌ها ۴

۱-۲-۲ مخمرها ۴

۱-۲-۳ سلول‌های پستانداری ۵

۱-۲-۴ حیوانات تراریخت ۵

۱-۳ گیاهان ۵

۱-۲-۱ تراریخت نمودن پایدار هسته ۶

۱-۳-۲ گیاهان با پلاست‌های تراریخت ۸

۱-۳-۳ ویروس‌های آلوده کننده‌ی گیاه‌ی ۸

۱-۳-۴ بیان موقت ژن در گیاهان ۹

۱-۳-۵کشت ریشه موئین ۹

۱-۳-۶ کشت تعلیقی سلول ۹

۱-۴ روش‌های انتقال ژن ۱۰

۱-۴-۱ روش غیر مستقیم ۱۰

۱-۴-۲ روش‌های مستقیم ۱۱

تراریخت نمودن پروتوپلاست ۱۱

۱-۵ گیاهان میزبان در کشاورزی مولکولی ۱۲

۱-۵-۱ محصولات برگی ۱۲

۱-۴-۲ محصولات دانه‌ای ۱۴

۱-۶ ملاحظات تکنیکی در تولید پروتئین نوترکیب ۱۶
۱-۶-۱ انتخاب پیشبرنده ۱۶
۱-۶-۲ عوامل مؤثر در پایداری mRNA و افزایش ترجمه ۱۷
۱-۶-۳ پایداری پروتئین و تجمع آن در میزبان‌های گیاهی ۱۸
۱-۷ واکسن‌های خوراکی ۱۹
۱-۸ باکتری *Escherichia coli* O157:H7 ..... ۲۰
۱-۸-۱ طبقه بندی *اشریشیاکلی* بر اساس بیماری زایی ۲۰
۱-۸-۲ بیماری‌زایی EHEC O157:H7: ۲۱
۱-۹ مطالعات تولید واکسن ۲۴
هدف از تحقیق ۲۶
فصل دوم ۲۷
۲-۱ مواد مورد نیاز ۲۸
۲-۱-۱ سویه‌های باکتریایی ۲۸
۲-۱-۲ پلاسمیدها ۲۸
۲-۱-۳ آنزیم‌ها و کیت‌ها ۲۹
۲-۱-۴ آنتی‌بیوتیک‌ها ۲۹
۲-۱-۶ محیط کشت گیاهی ۳۰
۲-۱-۷ بذور گیاهی ۳۰
۲-۲ روش‌ها ۳۱
۲-۲-۱ تهیه سازه pBI121-*et* ۳۱
۲-۲-۲ انتقال ناقل pBI121-*et* به *اگروباکتریوم تومی فاشینس* سویه LBA4404 ..... ۴۱
۲-۲-۳ کشت بافت و تراریختی گیاه ۴۴
۲-۲-۴ بررسی مولکولی گیاهان تراریخت ۴۶
فصل سوم ۵۱
۳-۱ طراحی سازه ژنی ۵۲
۳-۱-۱ ژن‌های کاندید ۵۲

۳-۲ بررسی‌های بیوانفورماتیکی ۵۶
۳-۲-۱ پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین نوترکیب EspA-Tir ۵۶
۳-۲-۲ پیش بینی محل‌های گلیکوزیله شدن ۵۷
۳-۳ ساخت سازه ۵۸
۳-۳-۱ تکثیر قطعات *tir* و *espA* ۵۸
۳-۳-۲ انجام واکنش SOEing PCR ۵۹
۳-۳-۳ همسانه‌سازی در ناقل همسانه سازی ۶۲
۳-۴ زیر همسانه سازی سازهی کایمریک *et* در ناقل بیانی گیاه pBI121 ..... ۶۶
۳-۴-۱ هضم آنزیمی ناقل pBI121 ..... ۶۶
۳-۴-۲ زیر همسانه‌سازی ژن کایمریک دو قسمتی *et* در ناقل pBI121 ..... ۶۶
۳-۵ انتقال سازه ژن pBI121-*et* به اگروباکتریوم ۶۸
۳-۶ تراریختی گیاه ۶۸
۳-۶-۱ انتخاب میزبان گیاهی ۶۸
۳-۶ کشت بافت وتراریختی گیاه تنباکو ۷۱
۳-۷ آنالیز مولکولی گیاه تراریخته ۷۲
۳-۷-۱ تائید حضور سازه‌ی ژنی در گیاه ۷۲
۳-۷-۲ تایید نسخه برداری از ژن نوترکیب ۷۴
پیشنهادها ۷۶
پیوست‌ها ۷۷
فهرست منابع ۸۷

فهرست شکل‌ها

شکل۲-۱ محل اتصال آغازگرها بروی سازه سه تایی *tir*،*eae* و *espA* به صورت شماتیک ۳۳

شکل۳-۱ پیش بینی ساختار سه بعدی پروتیین نو ترکیب Tir–EspA. ۵۷

شکل ۳-۲ جایگاه‌های مستعد گلیکوزلیه شدن درتوالی پروتئین کایمریک EspA-Tir ۵۸

شکل ۳-۳ تکثیر قطعه‌ی tir با ترجیح کدون گیاهی با آنزیم Pfu DNA polymerase. ۵۹

شکل۳-۴ تکثیر قطعه‌ی espA با ترجیح کدون گیاهی با آنزیم PfuDNA polymerase ۵۹

شکل۳-۵ نحوه‌ی اتصال انتهای مکمل در مرحله‌ی بسط همپوشانی در SOEing PCR ۶۱

شکل ۳-۶ محصول واکنش SOEing PCR با آنزیم Pfu DNA polymerase ۶۲

شکل۳-۷ تایید کلونینگ ژن مورد نظر با استفاده از روش کلنی PCR ۶۳

شکل ۳-۸ تایید کلونینگ ژن مورد نظر با استفاده از روش هضم آنزیمی. ۶۳

شکل ۳-۹ تصویر شماتیک سازه‌ی pJET-*et* ۶۴

شکل ۳-۱۰ نتیجه هم ردیف کردن توالی طراحی شده با نتیجه توالی‌یابی. ۶۵

شکل ۳-۱۱ هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 حاوی قطعه‌ی GUS ۶۶

شکل۳-۱۲ تصویر شماتیک سازه‌ی pBI121-*et* ۶۶

شکل ۳-۱۳ الگوی الکتروفورز محصول حاصل از PCR با کلنی حاوی قطعه ۶۷

شکل ۳-۱۴ تایید کلونینگ ژن مورد نظر با هضم آنزیمی pBI121 نوترکیب. ۶۷

شکل ۳-۱۵ تایید حضور ناقل pBI121-*et* نوترکیب ۶۸

شکل۳-۱۶: مراحل انتقال سازه ژنی به گیاهان توتون. ۷۲

شکل ۳-۱۷ نتیجه‌ی خالص‌سازی DNA از برگ‌های تراریخت ۷۲

شکل۳-۱۸ آزمون PCR بر روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخته ۷۴

شکل ۳-۱۹: الکتروفورز RNAی‌تام گیاهان تراریخته ۷۵۵

شکل ۳-۲۰ محصول واکنش RT-PCR از گیاهان تراریخت ۷۵۵

فهرست جدول‌ها

جدول۲-۱ توالی کدکننده دو پروتئین EspA و Tir ۳۲

جدول۲-۲ آغازگرهای طراحی شده جهت انجام واکنشSOEing PCR ۳۳

جدول ۲-۳ واکنش PCR با آنزیم *Pfu* DNA polymerase جهت تکثیر قطعه‌ی *tir* و *espA* ۳۴

جدول ۲-۴ برنامه PCR جهت انجام واکنش با آنزیم *Pfu* DNA پلیمراز جهت تکثیر قطعه‌ی *tir* و *esp*A ۳۵

جدول۲-۵ واکنش SOEing PCR با آنزیم *Pfu* DNA polymerase جهت تهیه سازه ژنی کایمریک *espA-tir* ۳۵

جدول۲-۶ برنامه SOEing PCR با آنزیم *Pfu* DNA polymerase جهت تهیه سازه ژنی کایمریک *espA-tir* ۳۶

جدول ۲-۷ ترکیبات مورد استفاده برای واکنش الحاق ۳۶

جدول۲-۸ واکنش PCR با آنزیم *Taq* DNA پلیمراز جهت تائید صحت زیر همسانه سازی ۳۷

جدول ۲-۹ برنامه PCR با آنزیم *Taq* پلیمراز جهت تائید صحت زیر همسانه سازی ۳۸

جدول ۲-۱۰ واکنش تائید با استفاده از برش دو آنزیمی ۳۸

جدول ۲-۱۱واکنش هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 با دو آنزیم ۳۹

جدول ۲-۱۲ ترکیبات مورد استفاده برای واکنش الحاق ۳۹

جدول ۲-۱۳ واکنش PCR باآنزیم *Taq* پلیمراز جهت تائید صحت زیر همسانه سازی ۴۰

جدول ۲-۱۴ برنامه PCR جهت انجام واکنش با آنزیم *Taq* پلیمراز ۴۱

جدول ۲-۱۵ واکنش تائید محصول همسانه سازی در ناقل گیاهی با استفاده از برش دو آنزیم ۴۱

جدول ۲-۱۶ مواد لازم جهت تهیه واکنش m_1 .....۴۹

جدول۲-۱۷ مواد لازم جهت تهیه واکنش m_2 .....۴۹

فهرست پیوست‌ها

پیوست الف ترکیب محیط LB مایع ۷۸

پیوست ب ناقل pBI121، خصوصیات کلی و محل کلون کردن چندگانه آن ۷۸

پیوست پ ناقل pJET1.2/Blunt خصوصیات کلی و محل کلون کردن چندگانه آن ۷۹

پیوست ت محیط کشت گیاهی MS (Murashige and Skoog, 1962) ۸۰

محلول مادری یدید پتاسیم (ماده غذایی کم مصرف) (X ۱۰۰۰) ۸۱

پیوست ث جدول کدون های مورد استفاده (Codon usage) در میزبان گیاه تنباکو ۸۳

پیوست ج تهیه بافر TFBI و TFBII ۸۳

پیوست چ طراحی آغازگرها اختصاصی برای ژن (*et*) با کمک نرم افزار Oligo ۸۴

چکیده

اشریشیاکلی سویه O157:H7 یکی از عوامل بیماری‌زایی مهم انسان و دام می‌باشد. اتصال باکتری به سلول میزبان، اولین گام در تثبیت و بیماری‌زایی است که به واسطه سیستم ترشحی نوعIII صورت می‌گیرد. در این میان EspA به عنوان اصلی‌ترین جزء تشکیل دهنده سیستم ترشحی ارتباط تنگاتنگی با اتصال اولیه‌ی باکتری به سلول میزبان دارد. . EspA به سبب ساختار خود و قرار گرفتن آن در غشاء خارجی باکتری، یک ایمنی زای قوی می‌باشد. Tir نیز پروتئینی است که پس از بیان در باکتری و از طریق سیستم ترشحی نوعIII به سلول میزبان منتقل و در غشاء آن مستقر می‌شود و نقش مهمی در اتصال باکتری به میزبان دارد. سیستم‌های بیان گیاهی به دلیل هزینه‌ی پایین تولید، انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای مشابه سایر سلول‌های یوکاریوتی، تشکیل ساختار صحیح پروتئین تولیدی و عدم آلودگی محصولات به عوامل بیماری‌زای انسانی، توالی‌های سرطان‌زا، پریون‌ها، جایگزینی مناسب برای سیستم‌های بیانی مرسوم محسوب می‌شوند. بیان آنتی‌ژن عوامل بیماری‌زایی میکروبی و ویروسی در گیاهان جهت تولید واکسن‌های خوراکی مطلوبیت ویژه‌ای دارند. به ویژه اینکه سلول‌های گیاهی به عنوان میکروکپسول‌های طبیعی از آنتی‌ژن‌های واکسن هنگام عبور از دستگاه گوارش محافظت می‌کنند. پروتئین‌های ایمونوژنیک کلیدی عوامل بیماری‌زا می‌توانند در بافت‌های گیاهی بیان شده و به عنوان واکسن خوراکی به انسان یا حیوانات ارزشمند اقتصادی خورانده شود. دریافت دهانی واکسن به دلیل هزینه کمتر و انجام ساده تر جایگزین جذاب و مناسبی برای تزریق می‌باشد. همچنین شانس دست یافتن به ایمنی مخاطی علیه عوامل عفونی که از این سطوح وارد می‌شوند با دریافت دهانی افزایش می‌یابد. در این تحقیق برای تهیه‌ی سازه‌ی ژنی حاوی قسمت‌های ایمنی‌زای *esp*A(e) و *tir*(t) که با استفاده از یک رابط پپتیدی به یکدیگر متصل شده بودند از روش SOEing PCR استفاده گردید. این ژن مصنوعی براساس کدون‌های گیاه بهینه‌سازی شد. در ادامه سازه‌ی فوق جهت همسانه‌سازی به ناقل pJET منتقل گردید. پس از اطمینان از صحت همسانه سازی از طریق توالی یابی، سازه¬ی دوتایی *et* جایگزین ژن GUS در ناقل بیانی گیاهی شد و تحت کنترل پیشبرنده دائمی CaMV 35S قرار گرفت. سپس ساختار تهیه شده به *Agrobacterium tumefaciens* وارد گردید و از آن برای تراریختی ریز نمونه‌های توتون استفاده گردید. پس از دو روز هم کشتی توام با اگروباکتریوم روی محیط هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها به محیط باززایی انتخابی حاوی کانامایسین منتقل شدند.شاخساره‌های باززایی شده با اندازه‌ی مناسب به محیط ریشه‌زایی انتقال یافتند. تائید تراریختی گیاه با آزمون PCR و با آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. برای تائید بیان ژن کایمریک *et*در سطح رونویسی از آزمون RT-PCR استفاده شد.

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱ کشاورزی مولکولی[1]

کشاورزی مولکولی به تولید داروهای مهم و پروتئین های ارزشمند تجاری، خارج از محل طبیعی آنها گفته می‌شود و شامل شناسایی پروتئینی‌هایی با فعالیت مناسب درمانی یا تشخیصی و بیان آن‌ها در یک میزبان با DNA ناهمگون[2] است. بیان انسولین، نوترکیب در باکتری یک مثال کلاسیک از کشاورزی مولکولی است (Daniell *et al*., 2001; Ma *et al*., 2003). یک ژن را در سیستم های گوناگون می‌توان بیان کرد، از این رو انتخاب یک سیستم بیانی مناسب ضروری می باشد (Daniell *et al*., 2001). در حال حاضر سیستم‌های بیانی مختلفی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب وجود دارند. سیستم‌های کشت باکتریایی، مخمری، سلول‌های حشرات، سلول‌های گیاهی و جانوری تراریخت از مهمترین سیستم‌های بیانی محسوب می‌شوند (Kresse *et al*., 1998; Schillberg *et al*., 2003).

[1] Molecular farming
[2] Heterologous DNA

۱-۲ سیستم‌های بیانی غیر گیاهی پروتئین‌های نوترکیب

۱-۲-۱ باکتری‌ها

باکتری‌ها مرسوم‌ترین سیستم بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌باشند. افزایش حجم تولید[۱] آسان، زمان کوتاه رسیدن از ژن به پروتئین و سادگی کشت از ویژگی‌های آن‌ها می‌باشد (Ma *et al*., 2003; Schillberg *et al*., 2003). با وجود این پروتئین‌های یوکاریوتی در باکتری‌ها به به دلیل تاخوردگی نامناسب[۲] به صورت ذرات مجتمع [۳] درمی‌آیند که بازسازی[۴] درون شیشه‌ای[۵] آنها کاری سخت و هزینه‌بر می‌باشد. از طرفی تشکیل پل‌های دی‌سولفیدی در باکتری خیلی کند و آهسته صورت می‌گیرد. از معایب دیگر باکتری‌ها می‌توان به هزینه‌ی بالا برای تهیه‌ی تجهیزات فرمانتوری و خالص‌سازی پروتئین‌ها، تولید اندوتوکسین و فقدان تغییرات پس از ترجمه[۶] اشاره کرد (Lau and Sun, 2009; Ma *et al*., 2003; Schillberg *et al*., 2003).

۱-۲-۲ مخمرها

بسیاری از مشکلات سیستم‌های باکتریایی با استفاده از سیستم‌های مخمری قابل حل است. مخمرها توانایی اضافه نمودن مولکول‌های قندی[۷] به پروتئین‌ها و ایجاد تاخوردگی[۸] صحیح را دارند. اما زنجیره گلیکان اضافه شده توسط مخمرها با سلول‌های پستانداری تفاوت‌های دارد از این رو در عملکرد مناسب پروتئین‌های پیچیده‌ی انسانی بیان شده در سیستم‌های مخمری تردیدهای جدی وجود دارد. البته در برخی سویه ها نظیر *Pichia pastoris* آنتی‌بادی‌های عملکردی تولید شده است (Banga, 2005).

---

[1] Scale up
[2] Misfolding
[3] Inclusion body
[4] Refold
[5] Invitro
[6] Post translational modifications
[7] Glycosylation
[8] Folding

۱-۲-۳ سلول‌های پستانداری

سلول‌های پستانداران تغییرات پس از ترجمه‌ای را به شکل قابل اعتمادتری انجام می‌دهند. نیاز به سرمایه-گذاری کلان، محدودیت افزایش حجم تولید و محیط‌های کشت گران از معایب آن می‌باشد. درعین حال سیستم‌های بیانی سلولی پستانداران منبعی برای ارگانیسم‌های پاتوژن (ویروس‌ها و پریون‌ها) یا توالی‌های سرطان‌زا می‌باشند. به هر حال امروزه بسیاری از آنتی‌بادی‌های منوکلنال در سیستم‌های کشت لاین سلول پستانداران تولید می‌شود (Schillberg *et al*., 2003).

۱-۲-۴ حیوانات تراریخت

حیوانات تراریخت ظرفیت تولید بالایی دارند. حیوانات تراریخت، پروتئین نوترکیب تولید شده را در شیر و سایر مایعات بدن ترشح می‌کنند. با این حال تکثیر حیوانات تراریخت فرآیندی پیچیده، دشوار و طولانی بوده و با توجه به مراحل اصلاحی امروزی بالابردن حجم تولید کند می‌باشد. در مورد حیوانات تراریخت به مانند سلول‌های پستانداری نگرانی‌هایی در مورد سلامت محصولات آن وجود دارد (Schillberg *et al*., 2003). علاوه بر موارد ذکر شده، استفاده از حیوانات تراریخت با محدودیت‌های قانونی و اخلاقی نیز مواجه است (Fischer and Emans, 2000).

۱-۳ گیاهان

امروزه تقاضا برای داروهای زیستی روز به روز در حال افزایش می باشد و چون معمولاً قیمت بالای این داروها، فراوانی و دسترسی به آنها را محدود می‌کند، لازم است سیستم‌هایی توسعه یابند که بتوانند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند (Daniell *et al*., 2001). امکان استفاده از گیاهان برای تولید داروهای نوترکیب بین سال های ۱۹۸۶ تا ۱۹۹۰ با بیان موفق هورمون رشد، یک اینترفرون،

سرم آلبومین انسانی و آنتی‌بادی عملکردی ثابت شد. این روزنه کافی بود تا توانایی گیاهان برای تولید پروتئین‌های مهم درمانی نشان داده شود (Fischer and Emans, 2000). علیرغم تردیدهای اولیه هم اکنون اولین نسل گیاهان تراریخت به مرحله‌ی تجاری رسیده‌اند که بسیاری از آنها تولید کننده‌ی پروتئین‌های درمانی نظیر آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، تنظیم کننده‌های رشد و هورمون رشد انسانی هستند (Schillberg *et al*., 2003). از نظر ملاحظات ایمنی، مشکلات سیستم‌های بیانی مبتنی بر فرمانتور و حیوانات تراریخت عموماً در گیاهان وجود ندارد اما ممکن است آلودگی‌های نظیر متابولیت‌های سمی، آلرژن‌ها و مواد شیمیایی مرزعه‌ای مثل علف‌کش‌ها و آفت کش‌ها وجود داشته باشد که لازم است پیش از مصرف حذف گردند (Commandeur *et al*., 2003). مزیت عمده‌ی گیاهان کاستن از هزینه‌های آماده‌سازی و هزینه‌های جاری است (Commandeur *et al*., 2003). سیستم‌های بیانی متنوعی مبتنی بر گیاهان وجود دارد که در ادامه برخی از آنها معرفی می‌شوند.

۱-۲-۱ تراریخت نمودن پایدار هسته[1]

تراریخت نمودن پایدارهسته، شامل وارد شدن ژن یا ژن‌های بیگانه به درون ژنوم هسته‌ای و تغییر آرایش ژنتیکی گیاه است. از اینرو گیاهان دستورزی شده خصوصیتی قابل توارث را که در گیاه غیر تراریخت وجود ندارد بروز می‌دهند (Obembe *et al*., 2011). این روش مرسوم‌ترین روش برای تولید گیاهان تراریخت است (Horn *et al*., 2004) و افزایش مقیاس[2] مهمترین مزیت این روش است. هزینه‌ی تولید

[1] Stable nuclear transformation
[2] Scale up

پروتئین نوترکیب در این روش اندک است، چراکه هزینه‌ی تولید پروتئین نوترکیب با مقیاس تولید رابطه‌ی معکوس دارد (Fischer and Schillberg, 2004). این روش شاید بهترین روش برای تراریخت نمودن محصولات دانه‌ای مانند غلات می‌باشد چراکه پروتئین تولید شده در گیاه به صورت طبیعی و طی مراحل رسیدن به بذر منتقل می‌شود (Fischer and Schillberg, 2004; Obembe *et al*., 2011). عیب عمده‌ی تراریخت نمودن پایدار هسته زمان نسبتاً طولانی توسعه‌ی یک لاین تراریخت است. توسعه‌ی یک لاین تراریخت نیازمند آماده‌سازی سازه‌ی ژنی، تراریخت نمودن گیاه، باززایی و آزمون نسل‌ها، به منظور اطمینان از پایداری بیان، فعالیت بیوشیمیایی محصول و نیز فقدان تغییرات فنوتیپی (در سطح مزرعه) است. بعلاوه نگرانی‌های ایمنی زیستی[1] ناشی از خطر پراکنش ژن انتقالی از طریق تلاقی خارجی[2] یا انتقال افقی ژن[3] و مخاطرات سلامتی بشر و مسائل زیست محیطی که برخاسته از احتمال وجود سمیت در پروتئین‌های نوترکیب است نیز وجود دارد (Fischer and Schillberg, 2004).

[1] Biosafety
[2] Out crossing
[3] Horizontal gene transfer

۱-۳-۲ گیاهان با پلاست‌های تراریخت[1]

برای تولید گیاهی با کلروپلاست تراریخت معمولاً DNA بیگانه از طریق بمباران ذره‌ای به درون ژنوم کلروپلاست وارد می‌شود. این گیاهان مشابه گیاهان تراریخت هسته‌ای رشد وپرورش پیدا می‌کنند. از این رو معایب مشابهی در خصوص مقیاس زمانی دارند. انتقال ژن به کلروپلاست مزایای زیادی را به همراه دارد از جلمه اینکه تعداد نسخه‌های ژن انتقالی زیاد می‌باشد و اثرات خاموشی ژن در کلروپلاست دیده نمی‌شود به همین دلیل سطح بیان ژن‌های انتقال یافته بسیار بالا می‌باشد. علاوه بر آن ژن‌های چندتایی و در ساختار اپرانی در کلروپلاست قابلیت بیان دارند. همچنین تجمع پروتئین‌ها در کلروپلاست، سمیت آنها را محدودتر می‌کند. عدم وجود DNA عملکردی در دانه‌ی گرده، فرار ژنی[2] را محدود می‌سازد. این درحالی است که تاخوردن پروتئین، اضافه شدن مولکول‌های قندی و تشکیل پیوندهای دی سولفیدی در کلروپلاست صورت نمی‌گیرد بر این اساس تولید گلیکوپروتئین‌ها در کلروپلاست محدود می‌شود. علاوه بر کلروپلاست گزراش‌هایی در مورد تراریخت نمودن سایر پلاست‌های گیاهی در هویج، گوجه فرنگی و برخی میوه‌جات وجود دارد (Fischer and Schillberg, 2004).

۱-۳-۳ ویروس‌های آلوده کننده‌ی گیاهی[3]

استفاده از ویروس‌های گیاهی به عنوان ناقل‌های بیانی موجب آلودگی سریع و سیستمیک گیاه و در نتیجه بیان سطوح بالایی از پروتئین مورد نظر در فاصله‌ی کوتاهی بعد از تلقیح می‌شود. به این جهت در مقایسه با دو روش قبل، از زمان مرحله‌ی توسعه[4] به صورت قابل توجهی کاسته می‌شود. درحالی که مقیاس پذیری آن در

---

[1] Transplastomic plants

[2] Gen scape

[3] Virus-infected plants

[4] Development