چکیده

مهندسی ژنتیک در گیاه با تولید مواد ارزشمند دارویی، هورمونی، واکسن و انواع پروتئینهای شامل آلبومین، اینترفرون، اریتروپوئیتین، ایمونوگلوبولین، IgG، IgA و آنتی ژنهای ایمنی زا در حال توسعه و تحقیق می باشد[۸]. گیاه تراریخته به منظور تولید واکسن باعث حذف زنجیره سرد در حمل و نقل و تولید راحت می گردد[۱۸]. اخیرا نسل جدیدی از واکسنها بصورت ژن، آنتی ژن و پپتید ایمنی زا ایجاد شده اند که باعث تحریک سیستم ایمنی به کمک سلولهای CD_8^+ و CD_4^+ می شوند که بسیار موثر و کم خطر هستند[۱۷]. بیماری هپاتیت C حدود ۱۷۵ میلیون نفر را در جهان مبتلا کرده و نبود واکسن موثر، شیوع بالای سیروس کبدی، عوارض هپاتیت مزمن و گسترش روزافزون، آن را به یک معضل بهداشتی و جهانی تبدیل کرده است[۲٤]. ویروس هپاتیت C دارای RNA تک رشته ای است که پروتئین ساختاری (Core) در آن نقش به سزایی در تولید کپسید، فعالیتهایی بیولوژیک و پاتوژنز دارد و در تهیه واکسن به علت ثبات توالی و عدم جهش از دیگر اجزا ویروس مهم تر است. در این تحقیق می خواهیم آنتی ژنهای ایمنی زای core 174 را جهت تولید پروتیئنهای تحریک کننده سیستم ایمنی انسان به گیاه سیب زمینی ترانسفورم کنیم. برای این منظور ژن core174 با کمک پرایمرهای اختصاصی از روی پلاسمید pIVEX2.4 با تکنیک PCR تکثیر شد. پلاسمید pBI121 توسط آنزیمهای برشی Xba1 و Sac1 هضم، ژن گزارشگر GUS خارج و ژن core174 جایگزین آن شد. وکتور نوترکیب به باکتری *E.coli DH5α* منتقل و بعد از تایید صحت کاست بیانی پلاسمید نوترکیب (هضم آنزیمی و PCR) به آگروباکتریم ترانسفورم شد. از طریق آلوده کردن گیاه زخمی به آگروباکتریوم حاوی core174 ترانسفورماسیون به گیاه سیب زمینی انجام گرفت. گیاه تراریخت در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین باززایی شد و سپس حضور ژن در ژنوم گیاه تراریخت با آنالیز مولکولی به اثبات رسید. آنالیزهای پروتیئن با روشهای SDS-PAGE و برادفورد تولید پروتئین نوترکیب را در گیاه سیب زمینی بیان کردند. نتایج حاصل نشان دادند که پروتیئن core174 در گیاه بیان شده است.

کلمات کلیدی: گیاه سیب زمینی، هپاتیت C، آگروباکتریم، Core 174

فـهـرست مـطـالـب:

فصل اول: ۱

مقدمه ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۱-۱- بیوتکنولوژی ۲

۱-۱-۲- بیوتکنولوژی گیاهی ۲

۱-۱-۳- زراعت مولکولی ٤

۱-۱-٤- علم ژنتیک از ابتدا تاکنون ٤

۱-۲- گیاهان ٥

۱-۲-۱- گیاه تراریخته ٦

۱-۲-۲- تاریخچه گیاه تراریخته ٦

۱-۲-۳- کشت بافت ۷

۱-۲-۳-۱- انواع کشت بافت ۸

۱-۲-٤- مراحل تولید گیاه تراریخته ۸

۱-۲-٥- دلایل استفاده از گیاه در مهندسی ژنتیک ۹

۱-۳- انتقال ژن به گیاه ۱۰

۱-۳-۱- روشهای انتقال ژن به گیاه ۱۱

۱-۳-۱-۱- انتقال مستقیم DNA به گیاه ۱۱

۱-۳-۱-۲- انتقال DNA با واسطه یک ناقل ۱۳

۱-٤- ساخت سازه ۱٦

۱-٤-۱- پروموتر ۱۷

۱-٤-۲- ترمینیتور ۱۷

۱-٤-۳- نشانگرها ۱۸

۱-٤-۳-۱- ژنهای گزارشگر ۱۸

۱-٤-۳-۲- نشانگرهای گزینشگر ۱۹

۱-٤-٤- بهینه سازی کدون ۲۰

۱-٥- بیان در گیاه تراریخته ۲۱

۱-٥-۱- میزان بیان ژن در گیاه تراریخته ۲۲

۱-۵-۲- خاموشی ژن در گیاهان تراریخته ۲۳
۱-۵-۳- تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در گیاه ۲٤
۱-٦- اگروباکتریوم ۲٤
۱-٦-۱- تاریخچه کشف پلاسمیدTi ۲٦
۱-٦-۲- پلاسمید Ti ۲٦
۱-٦-۳- ناقلین مبتنی بر آگروباکتریوم ۲۹
۱-٦-٤- انتقال ژن به سلول گیاه با واسطه اگروباکتریوم ۳۰
۱-۷- هپاتیت C ۳۱
۱-۷-۱- ویروس هپاتیت C ۳۱
۱-۷-۲- مزایای واکسنهای نوترکیب گیاهی ۳٦
۱-۸- گیاه سیب زمینی ۳۸
۱-۸-۱- دلایل استفاده از سیب زمینی ۳۸
۱-۸-۲- زراعت مولکولی در گیاه سیب زمینی(مزایا و معایب) ۳۹
۱-۸-۳- غده زائی ٤۰
۱-۸-٤- گیاه سیب زمینی و ژنتیک ٤۰
فصل دوم ٤۲
روش کار ٤۲
۲-۱- مواد مورد استفاده ٤۳
۲-۱-۱- مواد و آنزیمها ٤۳
۲-۱-۲- پلاسمید و باکتری ها ٤۳
۲-۱-۲-۱- پلاسمید pIVEX2.4α ٤۳
۲-۱-۲-۲- پلاسمید pBI 121 ٤٤
۲-۱-۳- آنتی بیوتیک های مورد نظر ٤٦
۲-۱-٤- محیط های کشت ٤۷
۲-۱-٤-۱- محیط کشت باکتریایی(LB) ٤۷
۲-۱-٤-۲- محیط های کشت گیاهی ٤۷
۲-۱-٤-۲-۱- تهیه محیط پایه MS ٤۷
۲-۱-٤-۲-۲- محیط غده زائی جامد ٤۹
۲-۱-٤-۲-۳- محیط کشت گیاهان تراریخته ٤۹

۲-۱-۵- الکترو فورز ۵۰
۲ -۱-۵-۱- TBE buffer 10X ۵۱
۲ -۱-۵-۲- طرز تهیه ژل آگارز ۵۱
۲ -۱-۵-۳- تهیه محلول بار گذاری (6X loading dye) ۵۲
۲ -۱-۵-٤- تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۵۲
۲-۱-٦- محاسبه غلظت DNA ۵۳
۲-۲- روشها ۵۳
۲-۲-۱- استخراج پلاسمید از باکتری به روش mini prepration ۵۳
۲-۲-۲- تهیه سلول مستعد E.Coli برای دریافت پلاسمید ۵٦
۲-۲-۳- ترانس فورم پلاسمید به سلول مستعد E.coli ۵۷
۲-۲-٤- تهیه سلول مستعد اگروباکتریوم برای دریافت پلاسمید ۵۸
۲-۳- آنتی ژن ایمنی زای هپاتیت C (Core 174 aa) ٦۰
۲-۳-۱- طراحی پرایمر ٦۰
۲-۳-۲- تکثیر قطعه Core 174 به کمک PCR ٦۱
۲-۳-۳- تشخیص قطعه ٦۲
۲-۳-٤- کلونینگ در پلاسمید بیانی pBI 121 ..... ٦۲
۲-۳-٤-۱- استخراج پلاسمید pBI121 ..... ٦۲
۲-۳-٤-۲- هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 و محصول PCR از ژن Core 174 ..... ٦۳
۲-۳-٤-۳- جداسازی پلاسمید فاقد ژن GUS از روی ژل آگارز ٦۳
۲-۳-٤-٤- رسوب گذاری با اتانول ٦٤
۲-۳-۵- اتصال قطعه Core 174 به $pBI121\ GUS^-$ خطی ٦٤
۲-۳-٦- ترانسفورم محصول لیگیشن به سلول های مستعد ٦۵
۲-۳-۷- آزمایشات تاییدی اتصال قطعهCore 174 به ناقل کلونینگ $pBI121\ GUS^-$ ٦٦
۲-۳-۷-۱- کلنی PCR ٦٦
۲-۳-۷-۲- هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 حاوی قطعه Core 174 ..... ٦٦
۲-۳-۷-۳-PCR با پرایمرهای CAMV355p و NOS-ter ٦٦
۲-۳-۸- ترانس فورماسیون اگروباکتریوم ٦۸
۲-۳-۹- ترانس فورماسیون ریز غده سیب زمینی با واسطه اگروباکتریوم ٦۸
۲-٤- آنالیز مولکولی ژن core 174 در گیاه تراریخته سیب زمینی ٦۹

۲-٤-۱- استخراج DNA ازگیاهان تراریخت ٦٩
۲-٤-۲- تکثیر ژن core 174 درگیاه تراریخته سیب زمینی ٧١
۲-٥- آنالیز پروتئین core 174 تولید شده در سیب زمینی تراریخت ٧٢
۲-٥-۱- استخراج کل پروتئین های محلول بافت گیاه ٧٢
۲-٥-۲- الکتروفورز پروتئین ها در ژل اکریل آمید ٧٢
۲-٥-۲-۱- مواد لازم برای ژل آکریل آمید ٧٤
۲-٥-۲-۲- روش انجام الکتروفورز ٧٥
۲-٥-۲-۳- رنگ آمیزی با کوماسی آبی R-250 ..... ٧٦
۲-٥-۲-۳-۱- مواد لازم برای رنگ آمیزی با کوماسی آبی ٧٦
۲-٥-۲-۳-۲- روش رنگ آمیزی ژل ٧٧
۲-٥-۲-٤- رنگ آمیزی با کوماسی G-250 کلوئیدی ٧٧
۲-٥-۲-٤-۱- مواد لازم برای رنگ آمیزی با کوماسی کلوئیدی ٧٨
۲-٥-۲-٤-۲- روش رنگ آمیزی ژل ٧٨
۲-٥-۲-٤-۳- نکات مربوط به رنگ آمیزی ٧٩
۲-٥-۳- اندازه گیری مقدار پروتئین ٧٩
۲-٥-٤- روش برادفورد ٨٠
فصل سوم ٨٣
نتایج ٨٣
۳-۱- کشت بافت ٨٤
۳-۲- نتایج ساخت سازه ٨٥
۳-۲-۱- رقیق کردن پرایمرها و سنجش خلوص آنها ٨٥
۳-۲-۲- تکثیر ژنCore 174 ..... ٨٦
۳-۲-۳- کلونینگ در پلاسمید بیانی pBI121 ..... ٨٦
۳-۲-٤- تراریختی سلولهایE.Coli توسط پلاسمید pBI121 نوترکیب ٨٨
۳-۲-٥- آزمایشات تاییدی حضور قطعه Core 174 در ناقل کلونینگpBI121 ..... ٨٨
۳-۲-٥-۱- کلنی PCR ٨٨
۳-۲-٥-۲- استخراج پلاسمید ٨٩
۳-۲-٥-۳- هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 حاوی قطعه Core 174 ..... ٩٠
۳-۲-٥-٤- PCR با پرایمرهای CAMV355p و Nos terminator ٩٠

۳-۲-٦- تراریختی اگروباکتریوم LBA4404 توسط پلاسمید نوترکیب pBI121 ..... ۹۱
۳-۳- نتایج تراریختی ۹۳
۳-۳-۱- تراریختی گیاه سیب زمینی توسط اگروباکتریوم نوترکیب ۹۳
۳-۳-۲-گیاه تراریخته ۹٤
۳-٤- آنالیز های مولکولی گیاه تراریخته ۹٦
۳-٤-۱- نتایج حاصل از استخراج DNA از گیاه ۹٦
۳-٤-۲-PCR بر روی ژنوم گیاه تراریخته ۹٦
۳-٥- آنالیزهای پروتئینی ۹۷
۳-٥-۱- استخراج پروتئینهای سلولی ۹۷
۳-٥-۲- الکتروفورز پروتیئن های سلولی در ژل آکریل آمید ۹۸
۳-٥-۳- اندازه گیری غلظت پروتئین ۹۹
فصل چهارم ۱۰۱
بحث و پیشنهادات ۱۰۱
فهرست منابع استفاده شده در این تحقیق ۱۱۳

فـهـرست اشکـال:

شکل ۱-۱- تصویر اگروباکتریوم ۲٤
شکل ۱-۲- تصویر بیماری گال طوقه حاصل از اگروباکتریوم ۲٥
شکل ۱-۳- تصویر پلاسمیدTi ۲٦
شکل ۱-٤- نحوه انتقال T-DNA از اگروباکتریوم به ژنوم گیاه ۲۸
شکل ۱-٥- سیستم ناقل دو گانه ۲۹
شکل ۱-٦- ویروس هپاتیتc و مدل ساختار ژنوم ویروس ۳٤
شکل ۱-۷- تصویر مکان غده زایی در گیاه سیب زمینی ٤۰
شکل ۲-۱- ساختمان pIVEX -2.4 α ٤۳
شکل ۲-۲- ساختمان پلاسمید pBI121 ..... ٤٥
شکل۲-۳- پلاسمید pBI121 نوترکیب ٦٥
شکل۲-٤- پلاسمید pBI121 نوترکیب با نمایش سایزهای مختلف قطعات ٦۷
شکل۳-۱ گیاه سیب زمینی در محیط جامد و مایع ۸٤
شکل۳-۲- تصویر غده سیب زمینی در محیط جامد غده زایی ۸٥
شکل۳-۳- ژل پلی اکریلآمید۱٥٪ برای مشاهده پرایمرها ۸٥
شکل۳-٤- محصولPCR از ژن Core 174 ..... ۸٦
شکل۳-٥- پلاسمید pBI121 استخراج شده ۸٦
شکل۳-٦- طراحی پلاسمید pBI121 به صورت شماتیک ۸۷
شکل۳-۷- هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 ..... ۸۷
شکل۳-۸- هضم آنزیمی با آنزیم های برشی XbaI وSacI به طور جداگانه و ایجاد پلاسمید خطی ۸۸
شکل۳-۹- نمایش کلنی ها E.Coli ترانسفورم شده با پلاسمیدpBI121+ Core 174 ..... ۸۸
شکل۳-۱۰- PCR از کلنی های رشد یافته در محیط حاوی انتی بیوتیک کانامایسین ۸۹
شکل۳-۱۱- PCR از پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه Core 174 ..... ۸۹
شکل۳-۱۲- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه Core 174 ..... ۹۰
شکل۳-۱۳- مشاهده قطعات کاست بیانی پلاسمید pBI121 ..... ۹۱
شکل۳-۱٤- پلاسمیدpBI121+Core174 ترانس فورم شده به اگروباکتریوم ۹۱
شکل۳-۱٥- تک کلنیهای رشد یافته اگروباکتریوم درمحیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین ۹۲

شکل۳ -۱۶- PCR از pBI121 استخراج شده از اگروباکتریوم ۹۲
شکل۳-۱۷- دیسک های آلوده شده با اگروباگتریوم ۹۳
شکل۳-۱۸- دیسک های جوانه زده ۹۴
شکل۳-۱۹- رشد گیاهان تراریخت بر روی محیط انتخابی ۹۴
شکل۳-۲۰- گیاه کنترل زرد شده در محیط انتخابی حاوی ۱۰۰ کانامایسین mg/l ۹۵
شکل۳-۲۱- ژنوم استخراج شده از برگ گیاه ۹۶
شکل۳-۲۲- PCR از ژن core 174 در ژنوم گیاهی ۹۷
شکل۳-۲۳- ژل پلی آکریل امید ۱۲٪ برای مشاهده پروتیئن ها در گیاه تراریخت و شاهد ۹۸

فـهـرست جـداول:

جدول۲-۱- حلالها واستوک های و میزان آنتی بیوتیک های لازم برای باکتری ٤٦
جدول۲-۲- مواد لازم برای محیط LB ٤٧
جدول۲-۳- استوک مواد ماکرو نوترینت محیط MS ٤٧
جدول۲-٤- طرز تهیه استوکx ۲۰ مواد میکرو نوترینت محیطMS ٤٨
جدول۲-٥- استوک آهن محیط MS ٤٨
جدول۲-٦- استوک ویتامین های محیطMS ٤٨
جدول۲-۷- مقدار سوکروز واگار لازم برای ۱ لیتر محیط MS ٤٩
جدول۲-۸- مواد محیط MLS برای گیاهان تراریخته ٥٠
جدول۲-۹- مواد میکرونوترینت محیط MLS ٥٠
جدول۲-۱۰- مواد بافر10 TBE buffer ٥١
جدول۲-۱۱- مقادیر لازم برای تهیه اگارز براساس طول DNA ٥١
جدول۲-۱۲- مواد louding buffer ٥٢
جدول۲-۱۳- مواد لازم برای بافرGET ٥٤
جدول۲-۱٤- موادلازم برایLysis Solution ٥٤
جدول۲-۱٥ مواد لازم برایPotasium solution ٥٥
جدول۲-۱٦- مواد بافرTE ٥٦
جدول۲-۱۷- مواد بافرFB ٥٧
جدول۲-۱۹-ساختمان پرایمرهای اختصاصی Core 174 ..... ٦٠
جدول۲-۲۰- مواد لازم برای PCR ٦١
جدول۲-۲۱- برنامه PCR برای تکثیر DNA(ژن Core 174) ٦٢
جدول۲-۲۲- مواد لازم برای هضم دو آنزیمی Xbal و SacI ٦٣
جدول۲-۲۳- مواد لازم برای لیگیشن ٦٥
جدول۲-۲٤- PCR با پرایمر های CAMV355p و NOS-ter و تعیین سایز قطعات آن ٦٧
جدول۲-۲٥– مواد لازم برای تهیه بافر CTAB ۷۰
جدول۲-۲٦- محلول استخراج پروتئین از غده سیب زمینی ۷۲
جدول۲-۲۷- مواد لازم برای تهیه ژل پلی آکریل آمید ۷٥

جدول۲-۲۸- نسبتهای بکار رفته در سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد ۸۲
جدول۳-۱- پیش بینی سایز باندهای بدست آمده از PCR با پرایمرهای 35Sو Nos و core 174a ۹۰
جدول۳-۲- میزان غلظت BSA و رقت های آن و هم چنین جذب نوری آنها ۹۹
جدول۳-۳- نمودار استاندارد برادفورد ۹۹
جدول٤-۱- آنتی بادیهای تشخیص دهنده و درمانی ساخته شده در گیاهان ۱۰٤

فصل اول:

مقدمه

۱-۱- مقدمه

۱-۱-۱- بیوتکنولوژی

بیوتکنولوژی محصول تعامل بین علم بیولوژی و تکنولوژی است که در واقع کاربرد علم و مهندسی در استفاده مستقیم و غیرمستقیم از موجودات زنده و یا اجزا و تولیدات آنها می باشد[۲].

تکنولوژی که DNA نوترکیب را از یک ارگانیزم به حیوان یا گیاه منتقل می‌کند بیوتکنولوژی نامیده می شود و به نام های دیگری مانند مهندسی ژنتیک، مهندسی زیستی و یا تغییرات ژنتیکی نیز شناخته شده است[۲]. اکنون مهندسی ژنتیک علمی است که امکان دستکاری دقیق ژنها را فراهم می کند و همچنین قدرت شکستن سد ژنتیکی طبیعی موجود میان انسان، حیوان و گیاه را دارد[۲۸].

دانش ما از ساختمان و بیان ژنوم گیاه از طریق استفاده از DNAی نوترکیب و تکنیکهای کلون کردن ژن حاصل می شود با استفاده از این تکنولوژی امکان جداسازی قطعه ای از DNA و بررسی خصوصیات آن وجود دارد و با کلون کردن توالیهای DNA در سلولهای باکتریایی این توالیها به مقادیر زیاد برای تجزیه و تحلیل تکثیر می گردند تکنولوژی DNAی نوترکیب، علاوه بر فراهم آوردن اطلاعات پایه در ارتباط با ساختار و بیان ژن، موقعیت، فرصت و تبادل دستکاری مواد ژنتیکی در بین موجودات مختلف را فراهم می کند[۲].

امروزه بیوتکنولوژی مدرن، منابع بزرگی جهت مصارف پزشکی، تولید غذا، دارو و کشاورزی را به ارمغان آورده است و به دنبال استفاده گسترده تر از تنوع ژنتیکی می باشد. در سال های اول دهه ۷۰ پیشرفتهای مهندسی ژنتیک و کاربردش در بیولوژی گیاهی منجر به تکامل صنعت بیوتکنولوژی در کشاورزی شده است [۱۰]. گیاهان چندین هزار سال است که به عنوان غذا و دارو مورد مصرف انسان قرار می گیرند ولی در چند دهه اخیر استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتورهای تولید پروتئین‌های داروئی هترولوگ مثل پروتئین انسانی ترویج یافته است[۴۵].

۱-۱-۲- بیوتکنولوژی گیاهی

بیوتکنولوژی گیاهی در سال ۱۹۸۳ با تولید اولین گیاه تراریخته توتون که یک ژن برگرفته از یک باکتری را بیان می‌کرد، متولد شد. از آن پس شاهد ظهور گیاهان تراریخته گوناگون و با توانایی

متفاوت بوده‌ایم. اولین گیاهان تراریخته فقط به بیان یک ژن که اغلب نشانگر بودند، می‌پرداختند ولی نسل دوم این گیاهان بیان ژن‌هایی با صفات ساده زراعی مانند تحمل به علف‌کش‌ها و آفات را رمز می‌کردند و نسل سوم گیاهان تراریخته، صفات چند ژنی مانند مسیرهای پیچیده متابولیک را بیان می‌کردند. در زیست فناوری گیاهی کار بر روی صفاتی که برای کشت و کار کشاورزان مناسب بودند به مرور کنار گذاشته شده و تولید محصولاتی با کیفیت و ارزش بالاتر برای مصرف‌کنندگان از اولویت بیشتری برخوردار گردیده است.

بیوتکنولوژی گیاهی دو دیدگاه کاملاً متضاد را پدید آورده است: نخست کسانی که تصور می‌کنند این موضوع قابلیت ایجاد انقلاب سبز بعدی را دارد و دوم آنهایی که مهندسی ژنتیک را به شدت خطرناک می‌دانند. البته برای بررسی مزایا و خطرات مهندسی ژنتیک به اطلاعات دقیق نیاز است و در این زمینه باید بر مبنای حقایق و واقعیت‌های موجود به مردم و جامعه اطلاع رسانی نمود.

نقطه شروع درک مفهوم بیوتکنولوژی گیاهی در متن تاریخچه اصلاح گیاهان قرار گرفته و برای این منظور باید مروری کلی بر ژنتیک کلاسیک و اصلاح سنتی گیاهان داشته باشیم که در حقیقت پایه و اساس بیوتکنولوژی گیاهی نوین می‌باشند. بیوتکنولوژی گیاهی شامل موضوعات بین رشته‌ای سنتی و نوین گوناگونی می‌باشد که در کنار یکدیگر با فراهم کردن ابزارهای مولکولی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و بیوفیزیکی، باعث سرعت بخشیدن به اصلاح سنتی و تولید گیاهانی می‌شوند که دارای خصوصیاتی چون افزایش محصول در قالب یک برنامه پایدارهستند[٤٦].

اصلاح گونه های کشاورزی باعث افزایش تولید محصولات از طریق مقاومت به آفات و بیماریها وعلفهای هرز و تنشهای محیطی غیر زنده می گردد و در ضمن باعث بهبود کیفیت و افزایش ارزش غذایی آنها نیز میگردد و تولید غذا را تا ۲۵ در صد در کشورهای در حال توسعه افزایش می دهد. بنابراین بیوتکنولوژی تکنیک جدید بشر برای مقابله با مشکلات و معضلات تامین غذا و حفظ محیط زیست در آینده است. کشت بافت گیاهی و تکنولوژی DNA نوترکیب از جمله واکسنها، هورمونهای انسانی و آنزیمها جنبه های مهم بیوتکنولوژی گیاهی را تشکیل می دهند [۲].

۱-۱-۳- زراعت مولکولی

گیاهان تراریخته به عنوان بیوراکتور برای تولید مواد بیوشیمیایی و دارویی استفاده می شوند[٤٧].بیوتکنولوژی تولیدکننده پروتئین نوترکیب در سلولها و ارگانیزم‌های زنده را زراعت مولکولی[1] و یا بیوفارمینگ می نامند که در آن از گیاهان به عنوان سیستم‌های میزبان بیان پروتئین استفاده می‌شود[١٤].

بیوتکنولوژی مدرن مولکولی باعث تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان با هزینه کمتر، میزان بیشتر و فعالتر از نظر بیولوژیکی و ایمنی بالاتر می‌شود.

تکنیک دیگر بیوفارماسوتیکال[2] است که در سال ۱۹۸۰ برای اولین بار از آن استفاده شده است و به داروهائی که از طریق مولکولار فارمینگ در سلولهای زنده تولید می‌شوند اطلاق می‌گردد[۱۹و۳۱و۳۲و۳۳].

۱-۱-٤- علم ژنتیک از ابتدا تاکنون

در سال ۱۹۰۰ میلادی کشف مجدد قوانین ارائه شده از سوی مندل، توسط درویس، شرماک و کورنز باعث شد که نظریات او مورد توجه و قبول قرار گرفته و مندل به عنوان پدرعلم ژنتیک شناخته شود. در سال ۱۹۵۳ با کشف ساختمان سه بعدی ژنها (DNA) از سوی واتسن و کریک، رشته‌ای جدید در علم زیست شناسی به وجود آمد که زیست شناسی ملکولی نام گرفت. و در خلال سالهای ۱۹۷۱ و ۱۹۷۳ دو رشته زیست شناسی ملکولی و ژنتیک که اولی به بررسی ساختمان و مکانیسم عمل ژنها و دومی به بررسی بیماری‌های ژنتیک و پیدا کردن درمانی برای آنها می‌پرداخت، ادغام شدند و مهندسی ژنتیک را به وجود آوردند که توانست رشته‌های مختلفی اعم از پزشکی، صنعت، کشاورزی و علوم پایه را تحت الشعاع قرار دهد. از کاربردهای مهندسی ژنتیک می‌توان موارد زیر را برشمرد:

---

1 Molecular Farming
2 Biopharmaceutical

۱- در زمینه علوم پایه، بررسی هایی مانند مکانیزمهای همانندسازی DNA و بیان ژنها در پروکاریوتها، یوکاریوتها و ویروسها و همچنین چگونگی ساخته شدن و تغییرات پروتئینهای داخلی سلول و همچنین مکانیزم ایجاد سرطان از جمله کاربردهای مهندسی ژنتیک است.

۲- در زمینه کشاورزی، اصلاح نژادی حیوانات و نباتات که باعث افزایش کیفیت و کمیت فرآورده های غذایی حاصل شده از آنان گردیده است.

۳- در زمینه کاربردهای انسانی، تشخیص بیماریهای ارثی، تولید انسولین انسانی، تولید هورمون رشد انسان، تهیه داروها و هورمونها با درجه خلوص بالا ... را می‌توان نام برد و از جدیدترین دستاوردهای مهندسی ژنتیک، هزینه های پایین درمان بیماری های ژنتیکی با ایجاد تغییرات در سلول تخم می باشد.

این علم نیاز به پشتوانه قوی علومی همچون بیولوژی سلولی ملکولی، بیوشیمی، فیزیولوژی و آمار و احتمالات دارد. هم چنین باید قوانین بین المللی سخت و محکمی برای این رشته علمی تبیین کرد زیرا ژنتیک در حالی که علم بسیار مفیدی برای انسان است، می تواند در صورت استفاده های غیرمنطقی از آن، نسل بشر را گرفتار عواقب وحشتناک کند[۱۵].

۱-۲- گیاهان

گیاهان رکن اصلی حیات بر روی زمین می باشند. زیرا که ۹۰ درصد انرژی و ۸۰ درصد پروتئین مورد نیاز انسان را تامین می کنند. بقیه انرژی مورد نیاز از حیوانات تامین می شود که آنها نیز غذای خود را از گیاهان دریافت می کنند.

از سه هزار گونه گیاهی که توسط انسان به عنوان غذا استفاده می شود فقط ۲۰ گونه زراعی بخش عمده انرژی مورد نیاز دنیا را تامین می کند و ۵۰ درصد این نیاز توسط ۸ گونه از غلات تامین می گردد. مواد معدنی و ویتامین ها توسط ۳۰ گونه از میوه جات و سبزیجات تامین می شود. افزایش روز افزون جمعیت باعث ایجاد نگرانی های زیادی در رابطه با تامین غذا شده است.

۱-۲-۱- گیاه تراریخته

ارگانیزم هائی که یک ژن یا DNA خارجی به صورت پایدار وارد ژنومشان شده است که یک پروتئین نوترکیب را بیان کنند، تراریخته[1] نامیده می شوند. به منظور تولید پروتئینهای نو ترکیب از سیستمهای بیانی مختلفی استفاده می شود که می توان به پروکاریوتها (باکتریها)، یوکاریوتها (مخمرها)، کشت سلولهای پستانداران، سلولهای حشرات، ویروسها، حیوانات و گیاهان تراریخته اشاره کرد که هر سیستم مزایا، معایب و محدودیتهای خاص خود را دارد. اگر این ارگانیزم میزبان، یک سیستم گیاهی باشد آن را گیاه تراریخته گویند[۱۶]. گیاهان زراعی تراریخته، گیاهانی شبیه به همتای طبیعی خود هستند، با این تفاوت که با استفاده از دستکاری ژنتیکی، در یک یا چند صفت ویژه نسبت به نوع طبیعی خود برتری دارند. کشت این گیاهان منافعی را برای تولیدکنندگان (کشاورزان) و مصرف‌کنندگان دربر دارد. تاکنون محصولات تراریخته در گیاهان مختلفی در جهان تولید شده‌اند[۱۷].

بیوراکتورها یک قدم کلیدی در تولید تجاری متابولیتهای ثانویه توسط بیوتکنولوژی هستند. روشهای اصلاحی در گیاهان دارویی بطور کلی به دو دسته سنتی (انتخاب توده ای، دورگه گیری و زراعت متابولیتی) و مدرن (تغییر در ساختار ژنتیکی) طبقه بندی می شوند. استفاده از هندسی ژنتیک متابولیتهای ثانویه شامل ایجاد جهش، انتقال ژن (استفاده از باکتری اگروباکتریوم و تفنگ ژنی)، دستکاری تنظیم کننده های نسخه برداری ژنها و کشتهای درون شیشه ای می باشد که نتیجه این تکنیکها، ایجاد گیاهی تراریخته و پدیده زراعت مولکولی گیاهان دارویی خواهد بود.

۱-۲-۲- تاریخچه گیاه تراریخته

رابطه بین سلامت انسان و گیاهان در سال ۱۸۹۷ یعنی زمانی که فردریک بایر آسپرین را به جهان عرضه کرد شناخته شد. در قرن بیستم صنعت داروسازی پا به عرصه وجود گذاشت و داروهای سنتتیک به جای داروهای طبیعی وارد بازار شدند، ولی هنوز ۱/٤ داروها از دانه، ریشه، برگ و عصاره گیاهان تهیه می شوند[۱۹و۲۰]. در سال ۱۹۷۸ اولین بار مهندسی ژنتیک بر روی گیاه، برای تولید دارو

1- Transgenic

صورت پذیرفت[۲۰] و اولین گیاه تراریخته در سال ۱۹۸۳ گزارش شد و سه سال بعد اولین پروتئین داروئی یعنی هورمون رشد انسانی در گیاه تنباکو ساخته شد. از سال ۱۹۸٦ تا ۱۹۹۹ بسیاری از داروهای نوترکیب در گیاه تولید شدند. از مسائل مهم در تولید داروها و واکسن‌های نوترکیب در گیاهان، فعالیت بیولوژیک آنها برای مصرف شان می‌باشد و سرانجام در سال ۱۹۹۰ اولین گیاه که آنتی‌ژن فعال از نظر بیولوژیکی را بیان کرد، تنباکو بود که پروتئین سطحی باکتری به نام استرپتوکوکوس موتانس را بیان کرد. همچنین اولین واکسن فعال از نظر بیولوژیکی، در سال ۱۹۹۵ در گیاه بیان شد[۸و۱۰و۲۰]. گیاهان تراریخته پس از تولید در شرایط آزمایشگاهی، به طور تجاری در زمینهای کشاورزی کشت داده شدند بطوریکه در سال ۲۰۰۵ گیاهان تراریختهٔ (GM)[1]، ۲۲۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی را دربر گرفته بودند[٤٥]. در گیاهان تراریخته حدود ۱۰۰ نوع پروتئین نوترکیب بیان شده است که برخی از آنها آماده واردشدن به بازار هستند.

واکسن‌ها و داروهای نوترکیب قبل از عرضه به بازار باید تحت آزمایشات کلینکی قرار بگیرند. اولین پروتئین نوترکیب در گیاه که به بازارعرضه شد اویدین[۲] بود که در ذرت بیان شده بود[۲۲].

۱-۲-۳- کشت بافت

با تکنیک کشت بافت می توان از یک سلول به گیاه کامل دست یافت. استفاده از این تکنیک به همراه موتاسیون باعث سرعت بخشیدن به تکثیر انبوه، تولید گیاهان عاری از بیماری، انجام کار در تمام طول سال و کاهش هزینه خواهد شد.

تکثیر گیاهان در شرایط آزمایشگاهی، روشی بسیار مفید جهت تولید داروهای گیاهی باکیفیت است. روش‌های مختلفی برای تکثیر در آزمایشگاه وجود دارد که از جملهٔ آنها، ریزازدیادی است. با این روش برای ایجاد کلون‌های گیاهی از تیرهٔ لاله در مدت ۱۲۰ روز بیش از ٤۰۰ گیاه کوچک همگن گرفته شد که ۹۰ درصد آنها به رشد معمولی خود ادامه دادند[۲۳].

1-genetically modified
2-Avidin

۱-۲-۳-۱- انواع کشت بافت

- **کشت گیاه کامل**: یک بذر که در شرایط آزمایشگاهی کشت شود و یک گیاهچه و در نهایت یک گیاه کامل تولید کند.
- **کشت جنین**: در این نوع کشت، جنین جدا شده و پس از حذف پوسته بذر، کشت می‌شود.
- **کشت اندام گیاهی**: در این کشت، انواع مختلفی مثل کشت مریستم، کشت ریشه، کشت نوک ساقه قابل تشخیص هستند.
- **کشت کالوس**: اگر یک بافت تمایز یافته جدا شود و در شرایط آزمایشگاهی تولید یک توده سلولی تمایز نیافته به نام کالوس نماید، این پدیده را کشت کالوس می‌نامند.
- **کشت سلول**: کشت سلولهای منفرد که به کمک آنزیمها یا به روشهای مکانیکی از یک بافت گیاهی یا سوسپانسیون سلولی بدست می‌آیند.
- **کشت پروتوپلاست**: این کشت در اثر هضم آنزیمی دیواره سلولی بوجود آمده‌است[٦].

۱-۲-٤- مراحل تولید گیاه تراریخته

۱. انتخاب ژن کد کننده یک پروتئین آنتی ژنی، که از انسان، حیوان، میکروب و یا یک ژن سنتز شده گرفته شده است.
۲. تکثیر ژن مورد نظر
۳. آماده سازی ناقل، که ژن مورد نظر به همراه کاست بیانی مخصوص گیاه برای بیان ژن در آن ناقل کلون شده باشد.
٤. ترانسفورم پلاسمید نوترکیب حاوی ژن در باکتری *E.coil*
٥. تائید حضور ژن بااستفاد ه از هضم توسط از آنزیمهای محدودالاثر و PCR
٦. ترانسفورم پلاسمید نوترکیب تائید شده به باکتری آگرباکتریوم تومه فاسینس
۷. ترانس فورماسیون گیاه با واسطه آگرباکتریوم و انتخاب لاین های از گیاهان تراریخته با بالاترین و مطلوبترین بیان
۸. ارزیابی آنتی ژنیسیتکی و میزان بیان پروتئین نوترکیب در گیاه تراریخته
۹. جداسازی پروتئین نوترکیب و مصرف آن

۱-۲-۵- دلایل استفاده از گیاه در مهندسی ژنتیک

مهندسی ژنتیک حدود ۲۰ سال است که بر روی سیستم میکروبی و حیوانی متمرکز شده است امااکنون گیاه و کشت سلول گیاه به دلیل دارا بودن مزایای ویژه برای تولید پروتئین داروئی و متابولیستهای ثانویه در میزان بالا مطرح میباشد.

گیاهان راکتورهای زیستی هستند که می توان از آنها برای تولید پروتئین های نوترکیب در مقیاس وسیع استفاده کرد. فاکتورهای مطلوب استفاده از سیستم های گیاهی برای تولید پروتئین های نوترکیب در مقایسه با سایر سیستم ها به شرح زیر می باشد:

- **سالم بودن فرآورده های حاصل**: گیاهان تراریخته میزبان پاتوژن های انسانی نیستند. از این رو فرآورده های آلوده به پاتوژن های انسانی مانند ویروس هپاتیت، ویروس HIV، عوامل سرطانزا و پاتوژنهای میکروبی مثل اندوتوکسین‌ها تولید نمی کنند [۲۵].
- **کاهش هزینه تولید**: هزینه کار با گیاه و بیان پروتئین در آن به میزان ۱۰-۲ درصد کمتر از هزینه کار با سیستم‌های فرمنتاسیون میکروبی و ۰/۱٪ سیستم‌های پستانداران است ودرضمن برداشت گیاهان نیاز به افراد ماهر ندارد. درحالیکه سیستم‌های فرمانتور میکروبی، حشرات یا دامی هزینه بالائی برای نگهداری دارند و با مشکلاتی مثل عدم ایمنی برای محیط زیست روبرو هستند [۲۶].

-تولید به میزان زیاد با استفاده از سیستم کشاورزی

- **تولید پروتئین های نوترکیب محلول و فعال از نظر بیولوژیکی در سیستم گیاهی**: درسیستم های میکروبی، تولید پروتئین نوترکیب در فرمانتور با ناپایداری پروتئین نوترکیب وغیر فعال بودن آن از نظر بیولوژیکی مواجه می باشد.
- **ایجاد تغییرات پس از رونویسی در پروتئین نو ترکیب**: این تغییرات شامل تاخوردگی صحیح پروتئین، گلیکوزیلاسیون، امیداسیون، فسفریلاسیون، یا اضافه کردن اسیدهای چرب و باندهای دی سولفیدی به پروتئین می باشد.

- **افزایش پایداری پروتئین نو ترکیب**: پروتئینهای نوترکیبی که برای مسیرترشحی هدفدار میشوند به دلیل ترشح به محیط خارج سلولی، مانع از تجزیه آنها در برابر پروتئازها می شود وباعث افزایش پایداری و بیان پروتئین ها می شود.
- **توانایی پردازش پس از ترجمه پروتئین های نوترکیب**: سلولهای گیاهی برخلاف سلولهای پروکاریوتی قادر به تاکردن و سرهم کردن درست آنتی بادیها و پروتئینها هستند [۲۵].
- **آسان بودن ترانس فورماسیون**
- **حذف فرایند تخلیص**: در تهیه واکسنهای خوراکی نیازی به استخراج پروتئین نوترکیب از بافت گیاهی نمی باشد.
- **آسان بودن افزایش مقیاس (scale-up)**: برای بالا بردن میزان بیان یک پروتئین در گیاهان تراریخته نسبت به حیوان تراریخته تا۱۰ برابر، زمان کوتاهتر لازم است
- **کاهش هزینه های انبارداری و حمل و نقل پروتئین های نوترکیب**: پروتئین نوترکیب موجود در حبوبات در دمای اتاق برای سالها بدون از دست دادن فعالیت بیولوژیکی ذخیره می شود.
- **سهولت استخراج پروتئین نوترکیب**: در صورت بیان پروتئین نوترکیب در بافتهای خاص مثل غده، دانه، برگ و اندامک‌های خاص گیاهی استخراج به آسانی انجام می گیرد.
- **اجتناب از مسائل اخلاقی مرتبط با حیوانات تراریخته**: امروزه برای عموم دستکاری ژنتیکی گیاهان نسبت به انتقال ژن به حیوانات و انسان قابل پذیرش تراست. در حال حاضر بشر تمایلی به استفاده غذاهای مشتق شده از بیوتکنولوژی ندارند در حالیکه داروهای مشتق شده از بیوتکنولوژی را بیشتر مردم قبول دارند [۳٤و۳۵و۳٦و۳۷و۳۸و۳۹و٤۰و٤۱و٤۲و٤۳و٤٤و۲۲و۱۰و۲۵].

۱-۳- انتقال ژن به گیاه

هدف از انتقال ژن به گیاه ایجاد تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی، انتخاب گیاه برتر از نظر ژنهای کنترل کننده صفات مطلوب و هم چنین حفظ تنوع گیاهی است. ابداع تکنیکهای انتقال ژن به گیاه بسیار سریع بوده و مبتنی بر روشهای متنوعی است.