بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

# استخراج و تخلیص فعال کننده ی پلاسمینوژن بافتی انسانی (t-PA) از گیاهان تراریخت توتون

نگارنده: حیدر سیفی نبی آباد

استادان راهنما :

دکتر مختار جلالی جواران  دکتر محمد مهدی یعقوبی

استاد مشاور: دکتر سامان حسینخانی

خرداد ۱۳۸۸

# فهرست

عنوان

صفحه


فصل اول- مقدمه

۱-۱ مقدمه..... ۱

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱ تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان..... ۳

۲-۲ مزایای استفاده از گیاهان تراریخته بعنوان راکتورهای زیستی..... ٤

۲-۳ جایگاه سلولی بیان پروتئین های نوترکیب..... ٥

۲-٤ آنتی بادی های سنتز شده در گیاهان..... ٦

۲-٥ گلیکوزیلاسیون..... ۷

۲-٦ هزینه تولید..... ۱۱

۲-۷ تخلیص پروتئین ها..... ۱۲

۲-۷-۱ آماده‌سازی نمونه های پروتئینی قبل از انجام کروماتوگرافی..... ۱۲

۲-۷-۲ تخلیص پروتئین های نوترکیب با استفاده از روشهای کروماتوگرافی..... ۱۳

۲-۷-۳ سیستم‌های کروماتوگرافی مایع..... ۱٤

۲-۷-٤ کروماتوگرافی به روش تعویض یون..... ۱٥

۲-۷-٥ کروماتوگرافی با جاذبهٔ هیدروفوبیک..... ۱٦

۲-۷-٦ کروماتوگرافی میل ترکیبی..... ۱٦

۲-۷-۷ کروماتوگرافی به روش فیلتراسیون ژل..... ۱۸

۲-۸ فعال کننده پلاسمینوژن بافتی انسانی..... ۱۸

۲-۹ بیوشیمی t-PA..... ۲۰

۲-۹-۱ ساختار و عملکرد t-PA..... ۲۰

۲-۹-۲ سنتز و ترشح t-PA..... ۲۱

۲-۹-۳ تمایل به فیبرین t-PA..... ۲۲

۲-۹-٤ بیماری قلبی ..... ۲۲
۲-۱۰ تاریخچه تولید t-PA ..... ۲۲
۲-۱۰-۱ همسانه سازی و بیان ژن t-PA انسانی ..... ۲۳
۲-۱۰-۲ مدلهای حیوانی آزمایش ها ..... ۲۳
۲-۱۱ فرضیه ها/ پیش فرض ها ..... ۲۵

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ کشت بذر توتون تراریخت بر روی محیط کشت ..... ۲٦
۳-۲ استخراج DNA از برگ توتون ..... ۲۹
۳-۲-۱ روش کار ..... ۲۹
۳-۳ سنجش کمیت استخراجی DNA ..... ۳۰
۳-٤ سنجش کیفی DNA استخراجی ..... ۳۱
۳-٤-۱ تهیه محلول اتیدیوم بروماید ..... ۳۲
۳-۵ ارزیابی گیاهان تراریخت به کمک تکنیک PCR ..... ۳۲
۳-٦ تهیه مایه باکتری ..... ۳۵
۳-۷ استخراج پلاسمید به روش دستی ..... ۳٦
۳-۷-۱ روش کار استخراج پلاسمید ..... ۳۷
۳-۸ ریز ازدیادی گیاهان تراریخت به کمک کشت بافت ..... ۳۷
۳-۹ استخراج RNA ..... ۳۸
۳-۱۰ ساخت cDNA ..... ٤۱
۳-۱۱ انجام PCR روی نمونه‌های cDNAی با آغازگرهای ژن کنترل داخلی ..... ٤۲
۳-۱۲ تکثیر cDNA با آغازگرهای ژن t-PA ..... ٤٤
۳-۱۳ بازیافت محصول PCR اضافی از ژل آگارز ..... ٤۵
۳-۱٤ استخراج پروتئین کل از گیاهان ..... ٤۷
۳-۱٤-۱ مراحل استخراج پروتئین‌های کل از برگ توتون ..... ٤۷
۳-۱۵ کمیت سنجی پروتئین‌ها ..... ٤۸
۳-۱٦ تخلیص پروتئین rt-PA از توتون‌های تراریخت ..... ٤۹
۳-۱٦-۱ طراحی ستون‌های تخلیص t-PA ..... ۵۰

۳-۱۷ بسته بندی ستون های کروماتوگرافی لیزین سفارز..... ۵۲
۳-۱۸ ساخت بافرهای مراحل تخلیص با ستون لیزین سفارز..... ۵۵
۳-۱۹ مراحل تخلیص به کمک ستون کروماتوگرافی لیزین سفارز..... ۵۶
۳-۲۰ الکتروفورز ژل -SDS ..... ۵۸
۳-۲۱ تخلیص با استفاده از ستون کروماتوگرافی ژلی..... ۶۲
۳-۲۲ روش تخلیص به کمک کروماتوگرافی ژلی..... ۶۳
۳-۲۳ آزمون زیموگرافی..... ۶۴

فصل چهارم: نتایج

۴-۱ کشت بذر توتون بر محیط کشت MS و آنالیز مقاومت به کانامایسین..... ۶۶
۴-۲ استخراج DNA از برگ گیاهان و بررسی کیفیت DNA ..... ۶۷
۴-۳ تعیین غلظت DNA ژنومی..... ۶۷
۴-۴ بررسی گیاهان تراریخت به روشPCR ..... ۶۸
۴-۵ کمیت و کیفیت سنجی RNA استخراج شده از برگ گیاهان ..... ۶۸
۴-۶ بررسی رونویسی t-PA به کمک تکنیک RT-PCR ..... ۶۹
۴-۷ بازیافت باند از ژل آگارز جهت توالی یابی ..... ۷۰
۴-۸ توالی یابی باند اضافی بازیافت شده از ژل ..... ۷۱
۴-۹ استخراج پروتئین های کل از گیاهان ..... ۷۷
۴-۱۰ تخلیص t-PA به کمک ستون کروماتوگرافی لیزین سفارز ..... ۷۷
۴-۱۱ استفاده از ستون های HighTrap desalting برای تخلیص نهایی ..... ۷۸
۴-۱۲ آزمون زیموگرافی ..... ۷۹

فصل پنجم: نتایج و بحث

۵-۱ نتیجه گیری و بحث ..... ۸۰
۵-۲ نتیجه گیری نهایی ..... ۸۵
۵-۳ پیشنهادات ..... ۸۶

فهرست منابع ..... ۸۸

فهرست جدول ها

جدول۲-۱: پروتئین های نوترکیب دارویی تولید شده در گیاهان ..... ۸
جدول ۳-۱: ترکیب بافر ضدعفونی کننده بذر ..... ۲۷
جدول ۳-۲: عناصر و مقادیر مورد نیاز در محیط کشت MS ..... ۲۷
جدول ۳-۳: مقادیر مورد نیاز محلول های مادری برای یک لیتر محیط کشت ..... ۲۸
جدول ۳-٤: ترکیبات بافر استخراج DNA ..... ۲۹
جدول ۳-۵: ترکیبات بافر نمونه گذاری ..... ۳۲
جدول ۳-٦: طرز ساخت بافر TBE5X ..... ۳۲
جدول۳-۷: مشخصات آغازگرهای اختصاصی t-PA ..... ۳۳
جدول ۳-۸: مخلوط اصلی واکنش PCR ..... ۳٤
جدول ۳-۹: چرخه دمایی واکنش PCR ..... ۳۵
جدول۳-۱۰: مواد تشکیل دهنده محیط کشت LB ..... ۳۵
جدول۳-۱۱: بافرهای مورد نیاز جهت استخراج پلاسمید ..... ۳٦
جدول۳-۱۲: مخلوط اصلی ساخت cDNA ..... ٤۱
جدول۳-۱۳: برنامه چرخه حرارتی ساخت cDNA ..... ٤۲
جدول۳-۱٤: مشخصات آغازگرهای اختصاصی ژن گلیسرآلدهید ..... ٤۳
جدول۳-۱۵: مخلوط اصلی واکنش PCR روی cDNA ..... ٤۳
جدول ۳-۱٦: چرخه دمایی تکثیر cDNA ..... ٤٤
جدول ۳-۱۷: برنامه چرخه دمایی تکثیر cDNA ژن t-PA ..... ٤٤
جدول ۳-۱۸: تمایل به فیبرین فعال کننده‌های پلاسمینوژن ..... ۵۲
جدول ۳-۱۹: خصوصیات محیط لیزین سفارز ..... ۵۳
حدول ۳-۲۰: نسبت محلول های تشکیل دهنده بافر اتصال ..... ۵٦
جدول ۳-۲۱: تهیه بافر 5X برای الکتروفورز SDS-PAGE ..... ٦۰
جدول ۳-۲۲: مقدار محلول ها برای ساختن ژلSDS-PAGE..... ٦۱
جدول ۳-۲۳: خصوصیات ستون های HiTrap$^{TM}$ Desalting Column ..... ٦۲
جدول ٤-۱: غلظت DNA باز یافت شده از ژل توسط دستگاه نانودراپ ..... ۷۱

فهرست شکل ها

شکل۲-۱: سیستم فیبرینولیتیک با اثر t-PA بر پلاسمینوژن ..... ۱۹
شکل۲-۲: مکانیسم عمل درون سلولی فیبرینولیتیک ..... ۲۰
شکل ۲-۳ : ساختار دامنه ای مولکول t-PA انسانی ..... ۲۱
شکل۳-۱: شمایی از ناقل پلاسمیدی pBI121 ..... ۲۶
شکل ۳-۲: توالی cDNA ژن t-PA ..... ۳۳
شکل ۳-۳: نحوه آماده سازی پودر لیزین سفارز جهت بسته بندی ستون..... ۵۵
شکل۳-٤: ستون کروماتوگرافی و بافرهای تخلیص با استفاده از ستون لیزین سفارز ..... ۵۸
شکل ۳-۵: استفاده از ستون ها برای تخلیص پروتئین سرم آلبومین گاوی ..... ٦۳
شکل ۳-٦: مرحله تخلیص توسط ستون کروماتوگرافی ژلی ..... ٦٤
شکل٤-۱: آنالیز مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین..... ٦٦
شکل ٤-۲: کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ..... ٦۷
شکل٤-۳: محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ..... ٦۸
شکل٤-٤: محصول استخراج RNA به روشRNAx plus ..... ٦۹
شکل٤-۵: نتایج RT- PCR ..... ۷۰
شکل ٤-٦: کیفیت DNA بازیافت شده از ژل..... ۷۱
شکل ٤-۷: نتیجه توالی یابی باند اضافی به صورت FASTA ..... ۷۲
شکل ٤-۸ : نتیجه توالی یابی روی قطعه cDNA بازیابی شده از ژل آگارز ..... ۷۳
شکل ٤-۹: نتیجه بلاست توالی حاصله از توالی یابی قطعه بازیابی شده از ژل آگارز ..... ۷۵
شکل٤-۱۰: دمین های حذف شده(کرینگل ۱و۲) از قطعه حاصل از پردازش متغییرRNA ..... ۷٦
شکل ٤-۱۱: توالی cDNA قطعه اضافی که با استفاده از پایگاه اطلاعات CDD مشخص شد که
مطابق با توالی دمین سرین پروتئازی می باشد ..... ..... ۷۷
شکل ٤-۱۲: مراحل تخلیص روی ژلSDS-PAGE (اکریلامید۸ درصد) ..... ۷۸
شکل ٤-۱۳: ژل آزمون زیموگرافی ..... ۷۹

**چکیده**:

امروزه کشاورزی مولکولی و تولید گیاهان تراریخته، باعث شده است که از گیاهان برای درمان بیماری هایی استفاده شود که تا پیش از این به وسیله داروهای شیمیایی یا مواد زیستی بدست آمده از حیوانات یا میکروارگانیسم ها درمان می شدند. از این رو گیاهان تراریخته می توانند به عنوان بیوراکتور جایگزین مناسبی برای سیستم های رایج بیان کننده پروتئین های نوترکیب باشند. یکی از داروهای مهم برای سکته های قلبی و مغزی، پروتئین نوترکیب t-PA (اسم تجاری اکتیواز[1] یا آلتپلاز[2]) است که به دلیل کمیاب بودن و قیمت بالا در دسترس عموم بیماران نیست. به همین علت اهمیت تولید آن در کشور فوق العاده زیاد احساس می شود. در این تحقیق گیاهان توتون تراریخت تولید شده توسط گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، به منظور استخراج و تخلیص پروتئین t-PA کشت داده شد. جهت بررسی بیان ژن در گیاهان تراریخت و اطمینان از تراریخت بودن آنها، از روش های مقاومت به آنتی بیوتیک، PCR و RT-PCR استفاده شد. با کشت بذر روی محیط کشت MS حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین فقط گیاهان تراریخت قادر به جوانه زنی شدند. همچنین در روش های PCR و RT-PCR تکثیر ژن t-PA با آغازگر اختصاصی نشان داد که فقط گیاهان تراریخت در مقایسه با شاهد، باند تکثیر شده مربوطه(1.7kb) را نشان دادند. همچنین در مرحله رونویسی مشخص شد که یک باند اضافی (650bp) تکثیر می شود که بعد از توالی یابی و جستجوی توالی های همپوشان مشخص شد که همان cDNA ژن t-PA می باشد فقط توالی دامنه های کرینگلی[3] t-PA از آن حذف شده است. بعد از تایید تراریخت بودن و بیان ژن در گیاهان، به کمک روشهای کروماتوگرافی تمایلی لیزین سفارز و فیلتراسیون ژلی اقدام به تخلیص t-PA نوترکیب انسانی گردید و با الکتروفورز ژل SDS خالص بودن t-PA و به کمک آزمون زیموگرافی فعال بودن این پروتئین نشان داده شد.

**کلمات کلیدی**: گیاهان تراریخت، تخلیص پروتئین، پروتئین t-PA ، کروماتوگرافی، لیزین سفارز، High trap desalting column ، پروتئین های نوترکیب و کشاورزی مولکولی.

[1]- Activase
[2]- Alteplase
[3]- Kringle

# فصل اول

# مقدمه

## ۱-۱ مقدمه

گیاهان تراریخت[۴](بطور کلی واژه تراریخت در کل به گیاهان و موجوداتی که از لحاظ ژنتیکی دستکاری شده‌اند اطلاق می‌شود) می توانند به عنوان بیوراکتورهای زنده برای تولید ارزان مواد دارویی عمل نمایند که این پدیده به کشاورزی مولکولی[۵] معروف می باشد. در اواخر دهه ۸۰ میلادی تکنولوژی تولید پروتئین و DNA نوترکیب در گیاهان باعث کشف سیستم های بیان گیاهی شد که قادر به تولید پروتئین های دارویی ارزان تر و ایمن تر گردید(Schillberg *et al.*, 1999). گیاهان تراریخت می توان به عنوان بیوراکتورهای مفید و جالب برای تولید ارزان و فراوان یک درشت مولکول[۶] نو ترکیب و فعال مثل ترکیبات خونی، واکسن ها، فاکتور های رشد، آنتی بادی ها و آنزیم ها استفاده نمود (Fischer *et al.*, 2004).

با استفاده از کشاورزی مولکولی می توان کربوهیدراتها، اسیدهای چرب، پلی پپتیدها، واکسن ها، آنزیم های صنعتی و پلاستیک های تجزیه پذیر زیستی را در سیستم های گیاهی تولید نمود. از آنجایی که قیمت داروهای زیستی بدست آمده از سیستم های کشت سلول های حیوانی یا میکروارگانیسم ها بالا می باشد بنابراین فراوانی تولید آنها را محدود می کند، لذا توسعه سیستمی که بتواند این داروها را با قیمت ارزان و حجم فراوان در اختیار مصرف کنندگان قرار دهد، امری ضروری می باشد. گیاهانی که دست ورزی ژنتیکی شده اند می توانند داروهای زیستی مطلوب انسان را در مقیاس وسیع و با هزینه کم تولید کنند. از این رو گیاهان تراریخت جایگزین مناسبی برای سیستم های رایج(فرمانتورها و بیو راکتورها) بیان کننده پروتئین های نوترکیب می باشند زیرا داروهای زیستی بدست آمده از گیاهان تراریخته نسبت به داروهای زیستی بدست آمده از فرمانتورها ضمن ارزان تر بودن، سالم تر هستند چون دیگر ترس وجود آلودگی های میکروبی (در مورد تولید از طریق فرمانتور) و یا احتمال وجود بیماری های مشترک (تولید از طریق حیوانات تراریخت) وجود ندارد. همچنین نگهداری و حمل و نقل آنها نیز آسان تر صورت می گیرد. در حال حاضر در جهان یک

[4] -Transgenic plants
[5] -Molecular Farming
[5] -Macro molecule

پذیرش عمومی برای تولید پروتئین های نوترکیب بوجود آمده است(Schillberg *et al.*, 1999). هم اکنون ما با رشد شدید تقاضا برای پروتئین های دارویی و تشخیصی مواجه هستیم، اما ظرفیت و امکانات موجود جوابگوی نیازهای مورد نظر نیست. به نظر می رسد که در آینده نزدیک جایگزینی گیاهان به جای سایر سیستم های تولیدی (بیورآکتور ها و...) ضروری گردد. آزمایش های پزشکی نشان می دهند که پروتئین های تولید شده در گیاهان از نظر فعالیت های زیست شناختی و ساختمانی با پروتئین های مشابه که از سیستم های کشت سلول های انسانی و حیوانی بدست آمده اند، قابل مقایسه می باشند.

با این وجود باید توجه کرد که پتانسیل بالای تولید پروتئین های دارویی در گیاهان فقط در صورتی محقق می شود که تولیدات حاصل، استانداردهای کیفی لازم را داشته باشند تا بتواند از مراجع نظارتی مجوز های لازم را کسب و در آزمایش های بالینی و درمان مورد استفاده قرار گیرند. برای رسیدن به این اهداف باید فناوری های مربوط به بهبود عملکرد از نظر کمی را توسعه داد، از کیفیت و پایداری محصولات مطمئن گردید و همچنین مراحل تخلیص و پردازش فراورده به خوبی انجام گیرد(Strasser and Altmann, 2004).

با این حال اگر از همه مزایایی که گیاهان تراریخت در تولید پروتئین های نوترکیب دارند بگذریم، چالش بزرگی که پیش روی تولید پروتئین های نوترکیب از این طریق وجود دارد بحث تخلیص و استحصال پروتئین های نوترکیب از گیاهان می باشد. چون گیاهان از یک طرف میزان و تعداد پروتئین های کل بیشتری از سیستم های پروکاریوتی و حتی یوکاریوتی مثل حیوانات دارند و از طرف دیگر آلودگی های ثانویه مثل رنگیزه ها، تانن ها، فنول ها و پلی فنولها که گیاهان دارند خیلی بالاست، به گونه ای که وجود این آلودگی ها کار تخلیص را سخت تر از سایر سیستم های بیانی کرده است. این آلودگی ها در مراحل تخلیص می تواند برای دستگاه هایی مثل ستون های کروماتوگرافی مضر بوده و باعث انسداد آنها شود(Thomas *et al.*, 2002).

بنابراین یافتن یک سیستم بازیابی و تخلیص پروتئین های نوترکیب از گیاهان که در کل به عنوان پروسه های پایین دستی مطرح است خیلی مهم و حساس می باشد. این حساسیت زمانی که هدف از تولید پروتئین نوترکیب استفاده دارویی به صورت تزریق وریدی باشد(همانند t-PA) بیشتر می شود. روش های تخلیص باید به گونه ای باشد که هزینه های تولید را (که عمده هزینه تولید پروتئین های نوترکیب را به خود اختصاص داده) کاهش داده و نیز کیفیت، کمیت، فعالیت و پایداری پروتئین تخلیص شده را حفظ کند.

در این تحقیق بذر گیاهان تراریخت توتون حاوی cDNA ژن t-PA انسانی (انتقال ژن توسط آقای معصومی اصل دانشجوی دکتری اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته بود) کشت گردید. بررسی بیان ژن نوترکیب t-PA در گیاهان تراریخت با استفاده از تکنیک های PCR و RT-PCR صورت گرفت. بعد از اطمینان از بیان t-PA در گیاهان تراریخت، با استفاده از روش های کروماتوگرافی تمایلی تخلیص t-PA صورت گرفت. نهایتاً برای سنجش فعالیت t-PA تخلیص شده از آزمون زیموگرافی استفاده گردید.

# فصل دوم

# بررسی منابع

## ۲-۱ تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان

در دنیای امروز تقاضا برای داروهای زیستی روز به روز در حال افزایش می باشد و چون معمولاً قیمت این داروها، فراوانی آنها را محدود می کند، لازم است سیستم هایی توسعه یابند که بتوانند داروهای زیستی را با قیمت مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهند. از آنجایی که یک ژن می تواند در سیستم های گوناگونی بیان گردد، بنابراین تعیین سیستمی با بیشترین بازده تولید پروتئین های نوترکیب امری ضروری می باشد. تعیین بهترین سیستم بیانی[۷] پروتئین های نوترکیب، یکی از مباحث مهم در بیوتکنولوژی می باشد. یک سیستم بیان کننده پروتئین های نوترکیب باید بتواند مواد زیستی را با بیشترین فعالیت بیولوژیکی و ایمنی[۸] و کمترین هزینه تولید کند. در حال حاضر بعضی از شرکت های معروف برای تولید پروتئین های نوترکیب از سیستم های فرمانتاسیون[۹] باکتریها (مانند *E. coli*) یا سلول پستانداران (مانند سلول های تخمدان موش چینی[۱۰]) استفاده می کنند (Daniell *et al*, 2001). اما این سیستم ها دارای محدودیت هایی می باشند. سیستم های بیانی که جهت تولید پروتئین های نوترکیب از سلول های پستانداران استفاده می کنند، فرآورده هایی را به وجود می آورند که کاملاً مشابه تولیداتی است که بطور طبیعی در بدن انسان سنتز می شوند. اما چون کشت این سلول ها گران تمام می شود، این سیستم در مقیاس محدود قابل اجرا است. استفاده از میکروارگانیسم ها مانند باکتری ها باعث می گردد که پروتئین های نوترکیب در مقیاس وسیع تولید شوند؛ اما مهمترین مشکل این سیستم ها این است که فرآورده های حاصل به طور محسوسی با فرآورده های طبیعی انسانی اختلاف دارند. برای مثال، پروتئین هایی که معمولاً در انسان گلیکوزیله می شوند، به وسیله باکتری ها گلیکوزیله نمی گردند(Daniell *et al*, 2001). زیرا باکتریها فاقد امکانات سلول های یوکاریوتی جهت انجام تغییرات پس از ترجمه[۱۱] می باشند. پردازش پس از ترجمه برای فعالیت زیستی تعداد زیادی از پروتئین های انسانی از جمله آنتی بادی ها لازم است (Cramer *et*

6-Expression system
7-Safety
8-Fermentation
9-Chinses hamster overy cells
10-Post-translational modification

(*al*., 1998). گیاهان تراریخته[۱۲] جایگزین مناسبی برای سیستم های رایج بیان کننده پروتئین های نوترکیب مانند کشت سلول های جانوری و پروکاریوتی می باشند. گیاهان تراریخته دارای ژن یا ژن هایی هستند که بطور مصنوعی به آنها الحاق شده است. می توان گیاهان تراریخته ای بوجود آورد که پروتئین های صنعتی و دارویی مورد نیاز انسان را بیان کنند. تعداد زیادی از پروتئین های انسانی از قبیل پروتئین های سرم خون، سیتوکین ها، آنزیم های لیزوزومی، آنتی بادی ها، واکسن ها و سایر پروتئین های دارای خواص دارویی را می توان در گیاهان تراریخته تولید کرد. آزمایش های پزشکی نشان می دهند که پروتئین های تولید شده در گیاهان از نظر فعالیت های زیست شناختی و ساختمانی با پروتئین های مشابه که از سیستم های کشت سلول های انسانی و حیوانی بدست آمده اند، قابل مقایسه می باشند. (Daniell *et al.*, 2001). امروزه پروتئین ها، داروها و آنتی بادی های نوترکیب متعددی در گیاهان بیان شده اند که مختصری از این تولیدات نوترکیب در (جدول۲-۱) آورده شده است.

## ۲-۲ مزایای استفاده از گیاهان تراریخته بعنوان راکتورهای زیستی [۱۳]

گیاهان تراریخته 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:

- بی خطر بودن فرآورده های حاصل: مهمترین مزیت کاربرد گیاهان تراریخته، سالم بودن فرآورده های حاصل از آنها می باشد. گیاهان تراریخته نمی توانند میزبان عوامل بیماری زای مشترک با انسان باشند. از این رو فرآورده های آلوده به پاتوژن های انسانی مانند ویروس هپاتیت، ویروس HIV ، عوامل سرطانزا[۱۴] و سموم باکتریایی تولید نمی کنند(Frrante and Simpson, 2001).

- توانایی پردازش پس از ترجمه پروتئین های نوترکیب: سیستم های گیاهی دارای امکانات سلول های یوکاریوتی برای پردازش پس از ترجمه پروتئین ها می باشند. بنابراین سلول های گیاهی

11-Transgenic
12-Bioreactor
13-Ocongenes

بر خلاف سلول های پروکاریوتی قادر به تا کردن درست آنتی بادی ها و پروتئین های چند زنجیره ای می باشند(Ferrante and Simpson, 2001).

- استفاده از روش های بهنژادی و تلاقی های جنسی جهت بدست آورن پروتئین های فعال چند زنجیره ای: در گیاهان می توان بدون استفاده از تغییر شکل دو گانه[15] آنتی بادی های فعال چند زنجیره ای تولید کرد(Haitt *et al*., 1989). وایت لم و همکاران (Whitelam *et al*., 1994) توالی های ژنی کد کننده نواحی سبک و سنگین زنجیره کاپا[16](یکی از زیرواحدهای یک آنتی بادی) را به یک گیاه تنباکو و توالی های ژنی کد کننده نواحی سبک و سنگین زنجیره گاما[17] را به گیاه تنباکوی دیگری الحاق کردند. بعد از تلاقی این دو گیاه تنباکوی تراریخته، در گیاهان نتاج آنتی بادی های کامل تولید شدند.

- کاهش هزینه تولید پروتئین های نوترکیب: با توجه به این مطلب که گیاهان برای تولید مواد زیستی فقط به دی اکسید کربن، انرژی خورشیدی و ترکیبات غیرآلی نیاز دارند و فرمانتورها برای تولید مواد زیستی به تجهیزات، مواد اولیه محیط و انرژی الکتریکی نیاز دارند، از این روگیاهان تراریخته جایگزین اقتصادی مناسبی برای سیستم های تولید بر پایه فرمانتورها می باشند (Yoshida *et al*., 2004). گزارش شده است که هزینه تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان تراریخته $\frac{۱}{۱۰۰}$ تا $\frac{۱}{۵۰۰}$ و حتی کمتر از هزینه تولید آنها در سلول های باکتری *E. coli* می باشد(Giddings, 2001).

- تولید به میزان زیاد با استفاده از سیستم کشاورزی

- کاهش هزینه های انبارداری و حمل و نقل پروتئین های نوترکیب

- حذف مرحله خالص سازی وقتی که بافت گیاهی حاوی پروتئین نوترکیب، خوراکی باشد (مانند واکسن های خوراکی) و امکان مصرف خوراکی داشته باشد

- اجتناب از مسائل اخلاقی مرتبط با حیوانات تراریخته.

14-Double Transformation
[16]- Kappa
[17]- Gamma

## ۲-۳ جایگاه سلولی بیان پروتئین های نوترکیب

توسعه سیستمی با کارایی بالا جهت بیان پروتئین های نوترکیب در گیاهان تراریخته به اصلاحاتی در فن آوری موجود نیاز دارد. علاوه بر کنترل رونویسی و ترجمه، تنظیم جایگاه ساخت پروتئین نوترکیب در سلول نیز اهمیت دارد. یکی از راهکارهای مناسب برای بیان پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخته، الحاق ژن یا ژن های کد کننده پروتئین نوترکیب مورد نظر در ژنوم کلروپلاست می باشد. دکوس و همکاران (Decose *et al.*, 2001) گزارش کردند که الحاق ژن بیگانه در ژنوم کلروپلاست تنباکو (تا ۱۰ هزار نسخه در هر سلول) باعث می شود میزان تجمع پروتئین نوترکیب تا ۴۷٪ پروتئین محلول کل افزایش یابد. با الحاق DNA بیگانه به درون ژنوم کلروپلاست، دو پدیده «اثرجایگاه[۱۸]» و «خاموشی ژن[۱۹]» که در تغییر شکل ژنوم هسته ای پدیده های عمومی می باشند، حذف می گردند(Staub *et al.*, 2000). همچنین با استفاده از دست ورزی ژنتیکی کلروپلاست، اثر منفی گیاهان تراریخته بر روی محیط زیست و نگرانی های موجود در زمینه فرار ژن نیز از بین می رود(Daniell, 1999). کلروپلاست ها می توانند پروتئین های یوکاریوتی را پردازش کنند. پروتئین های چاپرونی موجود در کلروپلاست نقش فعالی در بسته بندی و سرهم کردن پروتئین های بیگانه بیان شده در کلروپلاست دارند. بدین ترتیب بسته بندی و سرهم کردن درست پروتئین های نوترکیب در کلروپلاست مرحله پردازش درون شیشه ای پروتئین های دارویی را که بخش بزرگی از هزینه تولید را به وجود می آورد، حذف می کند. برای مثال، ۶۰٪ هزینه تولید تجاری انسولین در سیستم فرمانتاسیون باکتری *E.coli* ناشی از فرایند پردازش درون شیشه ای ( شامل تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و برش متیونین) می باشد(Daniell *et al*, 2001). از طرف دیگر یوشیدا و همکاران (Yoshida *et al.*, 2004) گزارش کردند، مناسب ترین سیستم برای بیان پروتئین های نوترکیب (مانند آنتی بادی ها و گلیکوپروتئین ها) که جهت فعالیت به پردازش پس از ترجمه (مانند

15-Position effect
16-Gene silencing

گلیکوزیلاسیون) نیاز دارند، سیستم انتقال وزیکولی[۲۰] می باشد. در حال حاضر با استفاده از این سیستم می توان پروتئین های نوترکیب را در شبکه آندوپلاسمی نگهداری کرد یا با استفاده از پپتیدهای راهنمای مختلف باعث تراوش آنها شد. به منظور به حداکثر رساندن میزان بیان پروتئین نوترکیب در این روش علاوه بر بهینه سازی آغازگر و 5'-UTR انتخاب پپتید راهنمای مناسب نیز مهم است. برای مثال افزودن پپتید راهنمای بازیابی شبکه آندوپلاسمی (KDEL) باعث گردید که میزان بیان پروتئین های نوترکیب ویسلین و قطعات زنجیره منفرد Fv[۲۱] (ScFv)، ۱۰۰ برابر افزایش یابد. بررسی و مطالعه بیشتر این سیستم امکانات زیادی را برای تولید وسیع پروتئین های نوترکیب درمانی و بیولوژیکی فراهم می کند (Chawla, 2000).

### ۲-۴ آنتی بادی های سنتز شده در گیاهان

آنتی بادی ها ابزار بسیار مناسبی برای پژوهش، حفاظت بدن در مقابل عوامل بیماریزا، شناسایی و درمان بیماری ها می باشند. براساس گزارش سازمان پژوهش و تولید داروی آمریکا در سال ۲۰۰۱، بیش از ۲۰٪ داورهای زیستی که در آزمایش های پزشکی بکار می روند، آنتی بادی ها هستند. آمارهای جدید نشان می دهند بیش از ۲۵۰ شرکت داروسازی بر روی ۷۰۰ نوع آنتی بادی کار می کنند که ۲۲۰ نوع آنها در آزمایش های پزشکی بکار می روند. کاربرد وسیع آنتی بادی ها منجر به مطالعه روش های جدید در جهت افزایش کارآیی و کاهش هزینه تولید آنتی بادی ها گردید. در میان روش های مطالعه شده، استفاده از گیاهان تراریخته بعنوان راکتورهای زیستی مناسب ترین روش شناخته شده است(Larrick *et al*., 2001). آنتی بادی های تولید شده در گیاهان شامل مولکول های کامل IgG و IgA ، مولکول های شیمر IgA و IgG ، مولکول های ترشحی IgG و IgA ، قطعات زنجیره منفرد Fv (scFv) ، قطعات Fab و دومن های متغیر زنجیرهای سنگین و سبک می باشند (جدول۲-۱).

17-Vesicular transport system
18-Single –chain Fv fragment

تا به امروز، درباره انتخاب مناسب ترین گونه یا بافت گیاهی برای تولید اقتصادی آنتی بادی ها توافقی صورت نگرفته است. اگرچه اخیراً، بیان آنتی بادی ها در سیب زمینی، سویا، یونجه، برنج و گندم با موفقیت همراه بوده است، اما تا به حال بیشتر از تنباکو برای بیان آنتی بادی ها استفاده می شود. مزیت اصلی استفاده از بافت های سبز (تنباکو، سویا، یونجه)، قدرت تولید آنها می باشد. یونجه و تنباکو در سال چندین بار برداشت می شوند. عملکرد سالانه یونجه ۲۵ تن در هکتار و عملکرد تنباکو بیش از ۱۰۰ تن در هکتار می باشد. در مقایسه، حداکثر عملکرد سالانه بذر گندم، برنج و ذرت تقریبا ۳ ، ۶ و ۱۲ تن در هکتار است. از مزایای دیگر تنباکو آسانی نسبی دستورزی ژنتیکی آن، تولید میزان زیادی بذر (تا یک میلیون بذر در هر گیاه) می باشد. اما بذور نسبت به برگ های سبز دارای ترکیبات فنولی کمتر و کمپلکس های لیپیدی و پروتئینی ساده تری هستند در نتیجه خالص سازی آنها آسانتر صورت می گیرد. مزیت دیگر بذور و غدد قدرت انبارداری بالای آنها می باشد. برای مثال میزان scFv در بذور برنج حاوی آن، بعد از ۱۶ ماه نگهداری در دمای اتاق کاهش معنی داری پیدا نکرد. نگهداری سیب زمینی به مدت ۱۸ ماه در دمای پایین باعث گردید غده ها فقط ۵۰٪ آنتی بادی فعال خود را از دست بدهند. کاربرد بافت های گیاهی دارای عمر انبارداری طولانی بعنوان بافت بیان کننده پروتئین نوترکیب این مزیت را دارد که نیازی به نزدیک بودن کارخانه فرآوری محصولات به مزرعه تولید کننده آنها نمی باشد و در نتیجه استفاده از این تشکیلات به دوره خاصی در سال محدود نمی گردد(Daniell *et al*, 2001).

### ۲-۵ گلیکوزیلاسیون

در داخل مجرای شبکه آندوپلاسمی، پروتئین های تازه سنتز شده در مسیرهای متعددی دچار تغییرات بیشتری می شوند. بعد ازحذف پپتید راهنما، پلی پپتید بسته بندی شده، پیوندهای دی سولفیدی ایجاد شده و بسیاری از پروتئین ها گلیکوزیله می شوند. گلیکوزیلاسیون آنتی بادی ها برای اتصال پایه FC آنتی بادی به گیرنده های سطحی سلول های دیگر ( مانند ماکروفاژ ) ضروری می باشد (Dieryck *et al.*, 1997 ).