۴۶۲۹۳

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی

عنوان:

انتقال ژن آنتی بادی V_{HH} به گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) و باززایی گیاهان تراریخت

نگارش:

سبا دیمیاد

۱۳۸۷ /۵/ ۲۵

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران

استاد مشاور:

دکتر حمید رجبی معماری

زمستان ۱۳۸۶

۴۶۲۹۳

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی

عنوان:

انتقال ژن آنتی بادی V_{HH} به گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) و باززایی گیاهان تراریخت

نگارش:

سبا دیمیاد

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران

زمستان ۱۳۸۶

۴۶۲۹۳

بسمه تعالی

تأیید اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه نهایی پایان نامه خانم سبا دیمیاد تحت عنوان: انتقال ژن آنتی بادی VHH به گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) و باززایی گیاهان تراریخت را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱. استاد راهنما	دکتر مختار جلالی جواران	دانشیار	
۲. استاد مشاور	دکتر حمید رجبی معماری	استادیار	
۳. نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر قاسم کریم زاده	دانشیار	
۴. اساتید ناظر: ۱-	دکتر رحیم حداد	استادیار	
۲-	دکتر قاسم کریم زاده	دانشیار	

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّنبخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد/ ~~رسالهٔ دکتری~~ نگارنده در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی است که در سال ۱۳۸۶ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران و مشاورهٔ جناب آقای دکتر حمید رجبی معماری از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ۴ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ۶ اینجانب سبا دیمیاد دانشجوی رشته بیو تکنولوژی کشاورزی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: سبا دیمیاد

تاریخ و امضاء:

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت‌مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاستهای پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها/ رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعملهای مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و **استاد راهنما** نویسنده **مسئول مقاله** باشند.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشرمی‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.۱۳۸٤/٦/۱۲پ

با سپاس از:

استاد ارجمندم جناب آقای دکتر جلالی جواران

که مرا از راهنمایی های ارزنده و حمایتهای بی دریغشان بهره مند ساختند

استاد گرامی جناب آقای دکتر رجبی معماری

که همواره با کمکهای ارزشمند و بی شائبه مرا یاری دادند

و اساتید ناظرمحترم جناب آقای دکتر کریم زاده و جناب آقای دکتر حداد

چکیده:

با توجه به طیف وسیع کاربردهای آنتی بادی های مونوکلونال در تشخیص و درمان بیماری ها، تولید آنها از منابع ایمن، دائمی و ارزان از اهمیت بسیاری برخوردار می باشد.

آنتی بادی تک دومنی با منشاء شتری (V_{HH}) که توسط Harmer در خانواده *Camelideae* کشف گردید، دارای ویژگی هایی مانند: شباهت به قطعات VH انسانی، حلالیت زیاد، تمایل بسیار و اختصاصی به آنتی ژن می باشد. بنابر این به سایر مشتقات آنتی بادی ترجیح داده می شود.

در این گزارش آنتی بادی نوترکیب تک دومنی علیه موسین MUC1 (V_{HH})، در گیاه کلزا که انتخاب مناسبی به عنوان یک سیستم بیانی اقتصادی می باشد، تولید گردید. بیان این آنتی بادی تحت کنترل پیش برندهٔ CaMV 35S و خاتمه دهنده nos صورت پذیرفت.

ژن V_{HH} به روش انتقال با اگروباکتریوم، به داخل ژنوم گیاه منتقل گردید. گیاهان تراریخت به کمک آنتی بادی کانامایسین با غلظت $25\ mg\ l^{-1}$ انتخاب و بذور نسل T_0 برداشت شدند. حضور و بیان ژن منتقل شده به گیاهان تراریخت به کمک تکنیک PCR و SDS-PAGE تأیید گردید.

این تحقیق اولین گزارش از انتقال ژن آنتی بادی نوترکیب به گیاه کلزا و ایجاد زمینه مناسب برای تولید دیگر پروتئینهای نوترکیب در این گیاه می باشد.

کلمات کلیدی: آنتی بادی نوترکیب، V_{HH}، کلزا، آنالیز گیاهان تراریخت، انتقال ژن.

فهرست

مقدمه ۵

۱-۱- پروتئین های نوترکیب ۵

۱-۲- سیستم های بیان پروتئین های نوترکیب ۶

۱-۲-۱- سیستم های سنتی ۶

۱-۲-۲- کشاورزی مولکولی ۷

۱-۳- اهداف تحقیق ۱۰

بررسی منابع ۱۱

۲-۱- سابقه تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان ۱۱

۲-۲- سابقه تولید پروتئین نوترکیب در کلزا ۱۵

۲-۳- آنتی ژن MUC1 ..... ۱۶

۲-٤- آنتی بادی ها ۱۸

۲-٤-۱- آنتی بادی مونوکلونال ۲۰

۲-٤-۲- آنتی بادی تک دومنی نوترکیب V_{HH} ۲۱

۲-۵- تاریخچه تولیدآنتی بادی تک دومنی V_{HH} در ایران ۲٤

۲-٦- روش های انتقال ژن به گیاهان ۲٤

۲-۷- اگروباکتریوم ۲۸

۲-۷-۱- انتقال ژن به گیاهان با استفاده از اگروباکتریوم ۳۰

۲-۷-۲- مزایا و معایب انتقال ژن به روش اگروباکتریوم ۳۰

۲-۸- میزبان های گیاهی ۳۱

۲-۸-۱- کشت سلول های گیاهی ۳۳

۲-۹- گیاهشناسی کلزا ۳۵
۲-۹-۱- منشاء پیدایش کلزا ۳۵
۲-۹-۲- مشخصات گیاهشناسی ۳۶
۲-۹-۲-۱- ارقام و گونه ها ۳۶
۲-۹-۲-۲- رشد و نمو کلزا ۳۶
مواد و روش ها ۳۸
۳-۱- مواد شیمیایی ۳۸
۳-۲- باکتری ها ۳۸
۳-۳- آغازگرها ۳۸
۳-٤- ناقل ۳۸
۳-۵- آنتی بیوتیک ها ۳۹
۳-۵-۱- استرپتومایسین ۳۹
۳-۵-۲- کانامایسین ٤۰
۳-۵-۳- سفاتوکسیم ٤۰
۳-٦- هورمون های گیاهی ٤۰
۳-٦-۱- هورمون BAP ٤۰
۳-٦-۲- هورمون IBA ٤۱
۳-۷- محیط های کشت ٤۱
۳-۷-۱- محیط کشت باکتریایی LB ٤۱
۳-۷-۲- محیط کشت گیاهی MS ٤۲
۳-۸- گیاهان کلزا ٤٤

۳-۸-۱- ضدعفونی و کاشت بذور کلزا ٤٤
۳-۹- تخلیص ناقل به روش هضم قلیایی ٤٥
۳-۱۰- انتقال ناقل PBI121 حامل ژن V_{HH} به آگروباکتریوم ٤٩
۳-۱۰-۱- تأیید ساختار PBI V_{HH} در باکتری با استفاده از PCR ٤٩
۳-۱۰-۲- تهیه ذخیره (STOCK) از کشت باکتری ٥٠
۳-۱۱- تراریخت نمودن کلزا با استفاده از آگروباکتریوم ٥٠
۳-۱۲- استخراج DNAی ژنومی از گیاه کلزا ٥١
۳-۱۲-۱- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA ٥٣
۳-۱۲-۲-الکتروفورز با ژل آگارز ٥٤
۳-۱۲-۲-۱- مواد و وسایل لازم برای الکتروفورز با ژل آگارز ٥٤
۳-۱۲-۲-۲- تهیه بافرTBE ٥٤
۳-۱۲-۲-۳- تهیه ژل آگارز ٥٥
۳-۱۲-۲-٤- تهیه بافر نمونه گذاری ٥٥
۳-۱۲-۲-٥- تهیه محلول اتیدیوم بروماید ٥٦
۳-۱۲-۳- الکتروفورز DNAی ژنومی ٥٦
۳-۱۳- استخراج پروتئین از برگ های گیاه کلزا ٥٧
۳-۱۳-۱- طرز تهیه بافر استخراج ٥٧
۳-۱۳-۲- مراحل استخراج پروتئین ٥٧
۳-۱٤- آنالیز گیاهان تراریخت ٥٨
۳-۱٤-۱- آنالیز در سطح DNA ٥٨
۳-۱٤-۲- آنالیز در سطح پروتئین ٥٨

نتایج و بحث ٦٥
٤-١- استخراج پلاسمید ٦٥
٤-٢- انتقال سازه به اگروباکتریوم ٦٦
٤-٣- تراریخت سازی کلزا ٦٧
٤-٤- مراحل رشدی گیاه تراریخت ٦٨
٤-٥- آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت در سطح DNA ٧٤
٤-٥-١- استخراج DNAی ژنومی ٧٤
٤-٥-٢- تعیین غلظت DNAی ژنومی ٧٤
٤-٥-٣- واکنش PCR ٧٥
٤-٦- آنالیز گیاهان تراریخت در سطح پروتئین به روش SDS-PAGE ٧٦
٤-٧- بررسی جوانه زنی در گیاهان نسل T_1 ..... ٧٧
٤-٨- بحث ٨٠
٤-٩- پیشنهادات ٨٥
فهرست منابع ٨٧

مقدمه

در طول دهه های گذشته، دستورزی DNA در محیط درون شیشه[1] از انتقال اطلاعات ژنتیکی میان موجودات پروکاریوت، به فناوری مبدل گردید که تولید مؤثر و کنترل شده پروتئین ها را در میزبان های بیگانه تسهیل می سازد.

تهیه بسیاری از پروتئین های یوکاریوتی که مصارف بالقوه صنعتی یا پزشکی دارند، بدلیل اندک بودن میزان پروتئین های طبیعی که در دسترس هستند، محدود می باشد و به همین دلیل پروتئین های نوترکیب به عنوان دارو در پزشکی و یا ابزار تحقیقات، اهمیت بسیاری پیدا کرده اند.

۱-۱- پروتئین های نوترکیب

پروتئین ها به طور گسترده به عنوان ابزاری در تحقیقات، پزشکی و صنعت کاربرد دارند. اما استخراج پروتئین ها از منابع طبیعی آنها بسیار سخت و هزینه بر می باشد. تنها در کشور آمریکا در هر سال ٦٥٠٠٠٠ مورد جدید از سرطان کلون تشخیص داده می شود و برای هر بیمار مورد درمان تومور، ۲۰-۱۰ میلی گرم آنتی بادی نوترکیب مورد نیاز می باشد و بنابراین در یک سال تنها جهت درمان این نوع خاص از تومور تقاضایی معادل ۱۳- ٦/٥ کیلوگرم آنتی بادی نوترکیب خالص در بازار وجود دارد (Stoger *et al.*, 2000). هیچکدام از سیستم هایی که تاکنون برای تولید آنتی بادی مورد استفاده قرار گرفته اند (مخمر، فاژ، باکتری وسیستم‌های پستانداران)، نمی توانند این میزان آنتی بادی را با قیمت مناسب و در مدت زمان کوتاه تولید کنند.

همچنین استفاده از پروتئین های دارویی که از منابع طبیعی گرفته شده اند، می تواند منجر به مشکلاتی شود. برای مثال، بسیاری از افراد به سبب استفاده از فرآورده های خونی و یا هورمون ها،

[1] *in vitro*

دچار بیماری می گردند. به علاوه استفاده بی رویه از منابع ژنتیکی کمیاب باعث نابودی این ثروت ملی و نعمت خدادادی می گردد و نیز پروتئین های دیگری مانند قطعات تک زنجیره متغیر (scFVs)[1] ، به طور طبیعی یافت نمی شوند. نظر به آمار قابل توجه بیماران سرطانی در ایران و جهان ضرورت تولید آنتی‌بادی های نوترکیب خاص سرطان‌ها بخصوص anti-MUC1 از منابع دائمی و ارزان اجتناب ناپذیر می‌باشد.

بنابر این سیستم های ساده و ارزانی که تولید ایمن پروتئین های نوترکیب را در مقیاس انبوه و قیمت ارزان ممکن سازد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

۱-۲- سیستم های بیان پروتئین های نوترکیب

تاکنون سیستم های بیانی بسیاری تثبیت و بطور تجاری بهره برداری شده اند (جدول۱-۱). گستردگی طیف سیستم های تولید پروتئین های نوترکیب که امروزه مورد استفاده قرار می گیرند، از پروکاریوت هایی مانند *E. coli* و *Bacillus subtilis* تا یوکاریوت هایی مانند مخمر، قارچ، کشت سلول های پستانداران و حشرات، جانوران و گیاهان می باشد.

۱-۲-۱- سیستم های سنتی

بیان ژن های هترولوگ در باکتری ها، ساده ترین و کم هزینه ترین راه برای تولید پروتئین دلخواه به منظور استفاده در تحقیقات، صنعت و اهداف پزشکی در مقیاس انبوه می باشد.

با توجه به اینکه پروتئین های نوترکیب بیان شده در سیتوپلاسم باکتری ها اکثراً نامحلول و بنابر این غیر فعال می باشند؛ پروتئین های محلول و فعال را می توان از سلول های یوکاریوتی تهیه نمود.

[1] SingLe Chain Fragment Variable

همینطور سلول های یوکاریوتی ظرفیت انجام تغییرات پس از ترجمه، مانند گلیکوزیله شدن، فسفریله شدن بقایای تیروزین، سرین، ترئونین و یا افزودن اسید چرب را دارند (Geisse *et al.*, 1996).

مزیت این سیستم های تولیدی، انجام تغییرات پس از ترجمه می باشد اما آماده سازی و کشت سلول های جانوری در مقیاس صنعتی می تواند برای تولید انبوه، پر هزینه و مشکل ساز باشد.

ضمن وجود موانع اجتماعی و اخلاقی برای استفاده از حیوانات تراریخت به عنوان سیستم تولید پروتئین، انتقال ژن به پستانداران اهلی مانند گوسفند، بز، خوک و گاو، یک فرآیند آسان نبوده و انبوه سازی آن بسیار کند می باشد (Echelard, 1996). به طور کلی پیش از تولید پروتئین نوترکیب، یک مرحله تولیدی طولانی آغاز می گردد و بسیاری از فرآیند های تنظیمی باید انجام گیرد (Echelard, 1996).

۱-۲-۲- کشاورزی مولکولی

اصطلاحاتی از قبیل:

Plant molecular farming، Biopharming و Greening of vaccine technology همگی برای تولید پروتئین های نوترکیب در مقیاس انبوه در سلول های زنده و یا ارگانیسم ها بکار می روند؛ که از گیاهان زراعی و یا حیوانات اهلی به عنوان میزبان های بیان کننده استفاده می شود.

مطالعات اخیر نشان داده اند که کشاورزی مولکولی در گیاهان از نظر عملی، اقتصادی و ایمنی، نسبت به بسیاری از سیستم های معمول، سودمند تر می باشند. همچنین پذیرش عمومی جهت استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین در مقیاس انبوه، در حال به افزایش می باشد.

جدول ۱- ۱- مقایسه سیستم های تولید پروتئین های نوترکیب (Ma *et al.*, 2003)

سیستم	هزینه تولید	دوره تولید	مقیاس پذیری	کیفیت تولید	گلیکوزیلاسیون	خطرات احتمالی	هزینه ذخیره سازی
باکتری	کم	کوتاه	زیاد	پایین	-	سموم داخلی	متوسط
مخمر	متوسط	متوسط	زیاد	متوسط	ناصحیح	خطر کم	متوسط
کشت سلولی پستانداران	زیاد	بلند	بسیار کم	بسیار بالا	صحیح	ویروس، پریون و عوامل سرطانزا	بالا
حیوانات تراریخت	زیاد	بسیار بلند	کم	بسیار بالا	صحیح	ویروس، پریون و عوامل سرطانزا	بالا
کشت سلولی گیاهان	متوسط	متوسط	متوسط	بالا	کمترین تفاوت	خطر کم	متوسط
گیاهان تراریخت	بسیار کم	بلند	بسیار زیاد	بالا	کمترین تفاوت	خطر کم	بسیار کم

همواره گیاهان بطور سنتی به عنوان منبع دارویی مورد استفاده قرار می گرفته اند، اما استفاده از گیاهان تراریخت در کشاورزی مولکولی به منزلهٔ انقلاب علمی و ظهور منبع جدید دارویی (شامل: پروتئین های پلاسما، آنزیم ها، فاکتورهای رشد، واکسن ها و آنتی بادی های نوترکیب) می باشد. تا چندی پیش، گسترهٔ استفاده از این نوع مواد دارویی بدلیل دشواری تولید آنها درخارج از بدن جانوران یا سلول های جانوری محدود بود. بکارگیری بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی گیاهی در دههٔ ۱۹۹۰ نشان داد که بسیاری از این داروها می توانند در گیاهان تولید شوند (Fischer *et al.*,2003 ;Schillberg *et al.*, 2002).

اهمیت سیستم های بیانی گیاهی به دلیل مزایایی است که نسبت به سایر سیستم های بیانی کلاسیک (بر اساس باکتری ها و سلول های جانوری) دارند. این مزایا عبارتند از:

۱. سلول های گیاهی مسیر سنتز پروتئین های یوکاریوت های عالی را دارا می باشند که مشابه سلول های جانوری عمل می کند و کمترین تفاوت را در گلیکوزیلاسیون پروتئین نشان می دهد؛ در حالیکه باکتری ها قادر به انجام اغلب تغییرات پس از ترجمهٔ بر روی مولکول های تولید شده برای پستانداران، نمی باشند (Cabanes- Macheteau *et al.*, 1999). در صورتی که تفاوت میان فرآیند های پس از ترجمهٔ گیاه و جانور ایجاد مشکل نماید، امکان مهندسی گیاهان برای مسیرهای اصلاحی تولید پروتئین وجود دارد (Bakker *et al.*, 2001).

۲. پروتئین های نوترکیب می توانند به طور مستقیم به بخش های درونی گیاهان مانند واکوئل ها، شبکه آندوپلاسمی یا اجسام پروتئینی هدایت شوند که در این مکان ها پایدارتر خواهند بود (Conrad and Fiedler, 1998). آنها می توانند در بخش های معینی مانند کلروپلاست بیان شوند (Staub *et al.*, 2000; Daniell *et al.*, 2001) و یا حتی به اندام های ذخیره ای مانند بذر ها هدایت شوند که در شرایط نامناسب دمایی برای چندین ماه، پایدار مانده و هزینه های نگهداری نیز کاهش می یابد (Stoger *et al.*, 2000).

۳. سیستم های گیاهی نسبت به سیستم های صنعتی که از بیوراکتورها برای تکثیر و پرورش سیستم های سلولی استفاده می کنند، بسیار اقتصادی تر می باشند.

٤. تجهیزات لازم برای برداشت گیاهان و فرآوری محصولات آنها در مقیاس انبوه در دسترس است.

۵. با تولید پروتئین نوترکیب در بافت های خوراکی گیاهی مانند سبزیجات (کاهو و گوجه فرنگی) و میوه ها (موز و...)، نیاز به تخلیص پروتئین وجود ندارد یا قابل حذف می باشد.

٦. با استفاده از گیاهان جهت تولید پروتئین های نوترکیب، نگرانی از همراه بودن عوامل بیماریزای انسانی و جانوری با پروتئین بیان شده (HIV و ویروس های هپاتیت) و یا تخلیص همزمان عوامل بیماریزای خونی و یا سرطان زا به همراه پروتئین نوترکیب، به طور کلی منتفی می گردد.

۱-۳- اهداف تحقیق

تهیه آنتی بادی های مونوکلونال علیه آنتی ژن MUC1 از منشاء شتر دو کوهانه و یک کوهانه، در سال ۲۰۰٤ به نتیجه رسید (Rahbarizadeh *et al.*, 2004). این آنتی‌بادی تک دومنی دارای خواص حلالیت، اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن و تمایل[1] خوبی می باشد. با توجه به اهمیت آنتی بادی تک دومنی V_{HH} در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری های سرطانی و هزینه بسیار بالای تولید آن با استفاده از سایر روش ها (مانند حیوانات، سلول های هیبریدوما و ...)، پروژه تولید این آنتی بادی در گیاهان از سال ۱۳۸۲ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس شروع شد. تولید این آنتی بادی در گیاه توتون در قالب دو رساله دکتری با موفقیت انجام شد (Rajabi-Memary *et al.*, 2006; Ismaili *et al.*, 2007).

به دلیل ویژگی های خاص گیاه کلزا از نظر تحقیقات انجام شده بر روی آن (در زمینه های انتقال ژن، باززایی گیاهان تراریخت و ...)، در قالب این تحقیق امکان تولید این پروتئین نوترکیب (آنتی بادی تک دومنیV_{HH}) با بهره گیری از پیشبرنده عمومی (CaMV 35S) در کلزا مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش ضمن انتقال ژن به کلزا با استفاده از اگروباکتریوم، باززایی گیاهان تراریخت از سلول های تراریخت صورت پذیرفت و در پایان آنالیز گیاهان تراریخت انجام شد.

[1] Affinity

فصل ۲:

بررسی منابع

بررسی منابع

۲-۱- سابقه تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان

برای قرن ها، گیاهان مولکول های با ارزش و سودمندی را برای انسان تولید نموده اند اما، تنها چندین دهه است که استفاده از گیاهان برای تولید پروتئین های هترولوگ خاص، ممکن شده است. اولین پروتئین دارویی که در گیاهان تولید شد (هورمون رشد انسانی) در سال ۱۹۸٦ در توتون تراریخت بیان گردید (Barta *et al.*, 1986). از آن زمان، بسیاری از پروتئین های انسانی در طیف وسیعی از گیاهان تولید شدند (جدول۲-۳). گیاهان به منزلهٔ کارخانجات تولید پروتئین به وسعت چندین هکتار می باشند. امکان بهره برداری از گیاهان برای ساخت پروتئین های نوترکیب پستانداران برای اولین بار در سال ۱۹۸۹، با بیان موفقیت آمیز آنتی بادی فعال با اندازهٔ کامل، در توتون تراریخت اثبات گردید (Hiatt *et al.*, 1989). این امر نشان داد که گیاهان قادر به سرهم کردن مولکول های پیچیده گلیکو پروتئینی عملکردی، با چندین زیر واحد می باشند.

صحت ساختار پروتئین های نوترکیبِ گرفته شده از گیاهان، در سال ۱۹۹۲ هنگامی که برای اولین بار از گیاهان برای تولید واکسن آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBV) استفاده شد، اثبات گردید (Mason *et al.*, 1992). همان گروه، در تحقیقات بعدی نشان دادند که واکسن تولید شده در گیاهان توتون، پس از تزریق به موش پاسخ ایمنی را افزایش می دهد (Thanavala *et al.*, 1995).

تولید پروتئین های نوترکیب برای مصارف دارویی در گیاهان تراریخت، یک راه حل مناسب برای تولید و جداسازی این مولکول ها از منابع طبیعی یا نوترکیب می باشد. با گسترش سریع فناوری کشاورزی مولکولی، بسیاری از پروتئین های درمانیِ با ارزش، با موفقیت در گیاهان تراریخت تولید