بسم الله الرحمن الرحيم

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

اعضای هیأت داوران نسخه ی نهائی پایان نامه خانم ملینا یاربخت تحت عنوان :

بررسی بیان ژن پروانسولین انسانی منتقل شده به کلروپلاست گیاه توتون در سطوح DNA، RNA و پروتئین

را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه ی علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکترمختار جلالی جواران	دانشیار	
۲- استاد مشاور	دکتر مریم نیکخواه	استادیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۴- اساتید ناظر: ۱- داخلی	دکتر محمد صادق ثابت	استادیار	
۲- خارجی	دکتر هوشنگ علیزاده	دانشیار	

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه‌های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی 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:

ماده ۱- در صورت اقدام به چاپ پایان نامه‌ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس اطلاع دهد.

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

" کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران از آن دفاع شده است."

ماده 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.

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

ماده 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 می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶- اینجانب **ملینا یاربخت** دانشجوی رشته‌ی **بیوتکنولوژی کشاورزی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی

دانشگاه تربیت مدرس

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 هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان 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 دانش آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه و رساله منتشر می‌شود 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 آیین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه، راسله 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 ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

ملینا یاربخت

۱۳۹۱/۴/۹

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست

از استاد گرامی؛ **جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران** که در کمال سعه صدر، بافروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند، کمال تشکر را دارم.

سپاس بیکران بر همدلی و همراهی و همگامی استاد عزیزم **سرکار خانم دکتر مریم نیکخواه** که همواره راه گشای اینجانب در اتمام واکمال پایان نامه بوده اند.

از اساتید گرامی **جناب آقای دکتر علیزاده و جناب آقای دکتر ثابت** که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از تمامی اساتید گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، که در طول تحصیل در دانشگاه تربیت مدرس از حضورشان بهره برده ام، سپاسگزارم.

امید آن که چراغ علم، ادب، تلاش و پشتکار این اساتید بزرگوار همواره روشنی بخش راه آینده من باشد.

از کارشناسان محترم آزمایشگاه **سرکار خانم مهندس آزموده، جناب آقای مهندس ایری و جناب آقای مهندس یادگاری** که در طول دوره انجام این پروژه از کمک های ایشان بهره مند بوده ام کمال تشکر را دارم.

از دوستان و هم آزمایشگاهی های عزیزم؛ آقای محب الدینی و خانم ها، لطفی، رزمی، سلیمانی و مرتضایی به پاس تمام همراهی هایشان کمال تشکر را دارم.

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی بیان ژن پروانسولین انسانی منتقل شده به کلروپلاست گیاه توتون در سطوح DNA، RNA و پروتئین

تحقیق و تدوین:

ملینا یاربخت

استاد راهنما:

دکتر مختار جلالی جواران

استاد مشاور:

دکتر مریم نیکخواه

بهمن ۹۰

چکیده:

تولید زیست‌داروها و پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور در حجم انبوه و ارزان تحت عنوان زراعت ملکولی (Molecular farming) معرفی می‌شود. دیابت به عنوان نارسایی سوخت و سازی گروه بندی شده است که در آن بدن از فقدان و یا عدم امکان استفاده از هورمون انسولین رنج می‌برد. با وجود تولید انسولین در سیستم‌های باکتریایی و مخمری تحقیقات بیشتر برای سایر روش‌های تولید پروتئین انسولین شامل بیان در گیاهان متمرکز شده است. گیاه توتون با نام علمی *Nicotiana* متعلق به خانواده Solanaceae و گونه *tabacum* می‌باشد که تاکنون بیشترین استفاده را جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب در بین گونه‌های گیاهی به خود اختصاص داده است. پروتئین‌های نوترکیب تولیدی در گیاهان می‌توانند به واحدهای زیرسلولی متفاوت در سلول‌های گیاهی نظیر سیتوزول، آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، کلروپلاست و یا واکوئل هدف‌گیری شوند. انتخاب صحیح واحد زیر سلولی جهت بیان پروتئین نوترکیب، نقش مهمی در سطوح تولید پروتئین‌های هترولوگ دارد. بیان پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست مزایای متعددی نظیر افزایش بیان ژن هدف و محدود نگه داشتن ژن انتقال یافته را به همراه دارد. ژن پروانسولین انسانی به همراه ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین- استرپتومایسین توسط تیم تحقیقاتی دکتر جلالی با استفاده از وکتور pKCZ و به روش تفنگ ژنی به کلروپلاست گیاه توتون انتقال یافته است. در قالب این پروژه، مراحل انجام باززایی و انتخاب گیاهان تراریخته بر روی محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین به منظور افزایش هموپلاسمی طی حداقل سه نسل انجام شد. بررسی گیاهان ترانسپلاستومیک در سطوح مختلف DNA، RNA و پروتئین به منظور تایید درج و بیان ژن در کلروپلاست گیاه توتون انجام شد. بررسی این گیاهان در سطح DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروانسولین، درج این ژن را در ژنوم کلروپلاستی گیاهان تایید کرد، به علاوه با آزمون RT-PCR رونویسی ژن هدف تایید شد. همچنین آزمون‌های بلات نقطه‌ای، الیزا و وسترن بلات به منظور اثبات بیان ژن هدف در سطح پروتئین و تعیین میزان پروتئین تولید شده انجام شد. در ادامه این پروژه جوانه‌زنی بذور نسل T_1 روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین و استرپتومایسین نیز مورد بررسی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: زراعت ملکولی، پروانسولین، دیابت، گیاه تراریخته، پروتئین‌های نوترکیب

فهرست عناوین:

فصل اول: مقدمه

مقدمه: ۱

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- زراعت مولکولی ۵
۲-۱-۱- انتخاب سیستم بیانی پروتئین‌های نوترکیب (مقایسه سیستم‌های بیانی) ٦
۲-۱-۲- انواع میزبان‌های گیاهی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ۸
۲-۲- انتقال ژن به کلروپلاست گیاهان ۱۰
۲-۲-۱- روش‌های انتقال ژن به کلروپلاست ۱۲
۲-۳- منشا و تکامل کلروپلاست ۱۳
۲-۳-۱- تنظیم بیان ژن‌های کلروپلاستی ۱۵
۲-۳-۲- رونویسی کلروپلاست و نقش تنظیمی آن ۱٦
۲-۳-۳- پیشبرنده پلاستید و ناقل‌های مناسب تراریختی کلروپلاست ۱۷
۲-٤- دیابت ۱۸
۲-٤-۱- انسولین ۲۰
۲-٤-۱-۱- بررسی بیان انسولین در سیستم‌های بیانی متفاوت ۲۱

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳- ۱- ژن پروانسولین ۲٤
۳-۲- تهیه مواد ۲٦
۳-۳- محیط‌های کشت، آنتی‌بیوتیک‌ها و هورمون‌ها ۲٦
۳-۳-۱- محیط کشت گیاهی MS ۲٦
۳-۳-۲- محیط باززایی ۲۸

۳-۳-۲-۱- تهیه محلول‌های ذخیره هورمون‌های باززایی ۲۸
۳-۳-۲-۲- تهیه محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین و استرپتومایسین سولفات ۲۹
۳-۳-۳ تهیه محیط MS آنتی‌بیوتیک‌دار ۲۹
۳-۳-٤- انتقال گیاهان به پرلیت و سازگار نمودن گیاهان باززایی شده ۳۰
۳-٤- آماده‌سازی باکتری ۳۱
۳-٤-۱ کشت باکتری *E. coli* ۳۱
۳-٤-۲- تهیه سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* ۳۱
۳-٤-۳- تراریخته‌سازی سلول‌های مستعد باکتری توسط ناقلین پلاسمیدی ۳۲
۳-۵- بررسی گیاهان تراریخته ۳۳
۳-۵-۱- استخراج DNA ژنومی گیاه توتون ۳۳
۳-۵-۱- ۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی ۳۵
۳-۵-۱- ۲- تهیه ژل آگارز ۳٦
۳-۵-۱-۳- تهیه بافر TBE ۳۷
۳-۵-۱-٤- تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۳۸
۳-۵-۲- آزمون تایید گیاهان تراریخته با استفاده از روش PCR ۳۸
۳-۵-۳- استخراج RNA ژنومی گیاه توتون ٤۱
۳-۵-۳-۱- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراجی ٤٤
۳-۵-٤ ساخت cDNA ٤٤
۳-۵-۵- انجام واکنش RT-PCR ٤٦
۳-۵-٦- استخراج پروتئین ٤۷
۳-۵-٦- ۱- سنجش غلظت پروتئین استخراجی ٤۸
۳-۵-۷- آزمون پروتئین استخراجی از گیاهان تراریخته با استفاده از روش SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات- الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید) ۵۰

۳-۵-۷-۱- محلول‌های مورد استفاده برای تهیه ژل پلی‌اکریل آمید ۵۱
۳-۵-۸- آزمون پروتئین استخراجی از گیاهان تراریخته با استفاده از روش الیزا (TAS-ELISA) ۵۵
۳-۵-۹- آزمون پروتئین استخراجی از گیاهان با استفاده از روش بلات نقطه‌ای (Dot blotting) ۵۹
۳-۵-۱۰- آزمون مقاومت به آنتی‌بیوتیک در بذور تراریخته ٦۰
۳-۵-۱۱- آزمون پروتئین استخراجی از گیاهان تراریخته با استفاده از روش وسترن بلات ٦۱
فصل چهارم: نتایج و بحث
٤-۱- کشت بافت و باززایی گیاهان تراریخته توتون حاوی پروانسولین ٦٤
٤-۲- بررسی گیاهان تراریخته ٦۷
٤-۲-۱- تایید حضور ژن پروانسولین در گیاهان تراریخته توتون ٦۷
٤-۲-۲ تایید حضور ژن پروانسولین در کلروپلاست گیاهان تراریخته توتون ٦۹
٤-۲-۳- بررسی بیان ژن پروانسولین در سطح RNA ۷۰
٤-۲-٤- بررسی بیان ژن پروانسولین گیاهان ترانس‌پلاستومیک در سطح پروتئین ۷۲
٤-۲-٤-۱- تعیین کمیت و کیفیت پروتئین کل استخراجی از گیاهان توتون ۷۲
٤-۲-٤-۲ بررسی گیاهان تراریخته در سطح پروتئین به روش SDS-PAGE ۷۳
٤-۲-٤-۳ بررسی بیان پروتئین پروانسولین انسانی در گیاهان تراریخته توتون به روش الیزا (TAS-ELISA) ۷۵
٤-۲-٤-٤- آزمون سنجش پروتئین با استفاده از بلات نقطه‌ای ۷۸
٤-۲-٤-۵- آزمون گیاهان تراریخته با استفاده از وسترن بلات ۷۹
٤-۲-۵- سنجش میزان جوانه‌زنی بذور تراریخته و شاهد (غیرتراریخته) در محیط انتخابگر ۸۱
٤-۳- بحث ۸۳
پیشنهادات ۹۵
منابع ۹٦

فهرست جداول:

جدول ۳-۱- مواد تشکیل دهنده محیط کشت MS گیاهی و غلظت آنها در محلول‌های ذخیره‌ای ۲۷

جدول۳-۲- مقدار مواد لازم برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج در روش CTAB ۳٤

جدول ۳-۳- مواد مورد نیازجهت تهیه بافر TBE (۵ X) ۳۸

جدول ۳-٤- مواد لازم برای انجام واکنش PCR.....۳۹

جدول ۳-۵- برنامه واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برای تکثیر ژن پروانسولین انسانی ٤۰

جدول۳-٦- برنامه واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برای اثبات گیاه توتون ترانسپلاستومیک ٤۰

جدول ۳-۷- دستورالعمل مصرف DNase ٤۳

جدول ۳-۸- مواد مورد نیاز ساختن cDNA در مرحله اول ٤۵

جدول ۳-۹ - مواد مورد نیاز برای انجام مرحله دوم cDNA سازی ٤٦

جدول۳-۱۰- برنامه واکنش زنجیره پلیمراز، برای تکثیر cDNA پروانسولین انسانی.....٤۷

جدول۳-۱۱- مواد لازم جهت تهیه معرف برادفورد.....٤۹

جدول۳-۱۲- مواد لازم جهت تهیه ژل SDS-PAGE ۵٤

جدول۳-۱۳- مواد لازم جهت تهیه بافر PBS ۵۷

جدول ۳-۱٤- مواد لازم جهت تهیه بافر پوشش دهنده ۵۸

جدول۳-۱۵- ترکیب محلول ضدعفونی‌کننده ٦۱

جدول ٤-۱- معادله استاندارد شده برادفورد (با شیب غلظت پروتئین BSA) ۷۲

فهرست شکل‌ها:

شکل ۲- ۱- ژنوم کلروپلاست گیاه توتون (IRB و IRA نواحی تکراری معکوس می‌باشند)..... ۱۵

شکل٤-۱- گیاهان باززا شده ترانس‌پلاستومیک حاوی ژن پروانسولین در محیط باززایی ٦٤

شکل٤-۲- نوساقه‌های قرار داده شده در محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک ٦٥

شکل٤-۳- گیاهان تراریخته و شاهد در محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک ٦٥

شکل٤-٤- گیاهان تراریخته توتون حاوی ژن پروانسولین انتقال داده شده به پرلیت ٦٦

شکل٤-٥- گیاهان تراریخته توتون حاوی ژن پروانسولین انتقال داده شده به گلدان ٦٦

شکل٤-٦- بذز گیری از گیاهان تراریخته ٦٧

شکل ٤-۷- DNA ژنومی نمونه‌ای ازگیاهان شاهد و تراریخته توتون حاوی ژن پروانسولین..... ٦٨

شکل٤-۸- تایید حضور ژن پروانسولین انسانی در ژنوم کلروپلاستی توتون ٦٨

شکل ٤-۹- تایید حضور قطعه ۲ کیلوبازی ژن پروانسولین انسانی در ژنوم کلروپلاستی توتون. ٦٩

شکل٤-۱۰- RNA استخراجی از گیاهان شاهد و ترانس‌پلاستومیک ۷۱

شکل ٤-۱۱- تایید رونویسی قطعه ۵۰۰ جفت باز ژن پروانسولین انسانی در ژنوم توتون..... ۷۱

شکل ٤-۱۲: منحنی و معادله رگرسیونی برادفورد برای تعیین میزان پروتئین محلول ۷۲

شکل ٤-۱۳- انجام SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده گیاهان تراریخته و شاهد غیرتراریخته..... ۷٤

شکل٤-۱٤- نمونه‌های پروتئین گیاهی فریز درای شده... ..... ۷٤

شکل ٤-۱٥- انجام SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده از باکتری‌های تراریخته و شاهد ۷٥

شکل ٤-۱٦- معادله استاندارد غلظت‌های مختلف پروتئین انسولین ۷٦

شکل ٤-١٧- آزمون پروتئین پروانسولین در گیاهان تراریخته ترانس پلاستومیک توتون (حاوی ژن پروانسولین) به روش ELISA. ٧٧
شکل ٤-١٨- میزان تجمع پروانسولین در گیاهان تراریخته توتون..... ٧٧
شکل٤-١٩- آزمون بلات نقطه‌ای در گیاهان ترانسپلاستومیک..... ٧٨
شکل ٤-٢٠- آزمون بلات نقطه‌ای در باکتری ٧٩
شکل ٤-٢١- آزمون بیان پروانسولین در گیاهان ترانس‌پلاستومیک به روش وسترن بلات ٨٠
شکل ٤-٢٢- آزمون بیان پروتئین پروانسولین در باکتری‌های تراریخته به روش وسترن بلات ٨٠
شکل ٤-٢٣- بررسی بذور شاهد (غیر تراریخته) در محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک ٨١
شکل ٤-٢٤- بذور تراریخته جوانه زده در محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک ٨٢

فصل اول

مقدمه

مقدمه:

تا این اواخر، داروهای استفاده شده جهت درمان بیماری‌ها شامل اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای مسکن، هورمون‌ها و یا سایر مواد دارویی به میزان زیادی بر مبنای تولید مولکول‌های آلی نسبتا کوچک بودند که به کمک میکروب‌ها و یا شیمی آلی ساخته می‌شدند. امروزه به طور گسترده‌ای توجه به سمت عوامل دارویی متمرکز شده است که از مولکول‌های پروتئینی پیچیده‌تر و بزرگ‌تر ساخته می‌شوند. پروتئین‌ها مولکول‌های بزرگی هستند که از زنجیره‌های طویل شامل زیرواحدهای اسیدآمینه‌ای تشکیل شده‌اند. قرن‌های زیادی است که گیاهان مواد مفیدی را برای بشر تامین کرده‌اند، اما استفاده از آن‌ها جهت تولید پروتئین‌های ویژه تنها در ۲۰ سال اخیر ممکن شده است. کشاورزی مولکولی به معنای استفاده از گیاهان جهت تولید مواد دارویی می‌باشد. کشاورزی مولکولی دارای پتانسیل بالایی در تولید نامحدود پروتئین‌های نوترکیب (آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، عوامل رشد و آنزیم‌ها) می‌باشد و در حال حاضر در جهان پذیرش عمومی برای تولید این پروتئین‌های نوترکیب از طریق گیاهان بوجود آمده است (Ma *et al.*, 2003).

از آنجایی که اکثر ژن‌ها می‌توانند در سیستم‌های متفاوت بیان شوند، تعیین این‌که کدام سیستم بیشترین مزیت را برای تولید پروتئین نوترکیب ارائه می‌دهد ضروری است. سیستم بیانی ایده‌آل سیستمی است که راحت‌ترین و فعال‌ترین ماده از نظر بیولوژیکی را با کمترین هزینه ممکن تولید کند (Daniell *et al.*, 2001). انتخاب سیستم بیانی برای تولید پروتئین نوترکیب در سطح بالا به عوامل متعددی بستگی دارد. این عوامل شامل ویژگی‌های رشدی سلول، سطح بیان، بیان درون و خارج سلولی، تغییرات بعد از

ترجمه و فعالیت بیولوژیک پروتئین هدف می‌باشد. به‌علاوه انتخاب سیستم بیانی ویژه نیاز به بودجه‌بندی در روند انجام کار و در نظر گرفتن سایر ملاحظات اقتصادی دارد (Rajabi memari *et al*., 2010).

از جمله مزایای سیستم‌های بیانی گیاهی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- سیستم‌های گیاهی نسبت به سیستم‌های تخمیری و بیوراکتورها اقتصادی‌تر هستند. به طورکلی، برآوردهای انجام شده نشان می‌دهد هزینه تولید با استفاده از سیستم‌های گیاهی حدود ۲ تا ۱۰ درصد سیستم تخمیری و ۰/۱ درصد سلول جانوری می‌باشد (Twyman *et al*., 2003).

۲- تولید پروتئین‌های نوترکیب به منظور تهیه واکسن‌های خوراکی دارای مزایایی از قبیل شکل آسان‌تر مصرف، هزینه کمتر تولید، ذخیره‌سازی راحت‌تر و تحویل با صرفه‌تر اقتصادی می‌باشد (Tiwari *et al*., 2009)، با این وجود نکته قابل توجه این است که امکان تجزیه این واکسن‌های خوراکی در معده و روده قبل از تحریک پاسخ ایمنی وجود دارد و به منظور حفاظت آن‌ها در سیستم گوارشی، حاملان متعددی جهت عبور سالم این پروتئین‌ها به روده توسعه یافته‌اند. این حامل‌ها شامل سویه‌های نوترکیب میکروارگانیسم‌های ضعیف شده، ابزارهای بیوکپسوله کردن[1]، نظیر لیپوزوم‌ها می‌باشند. به‌علاوه، هدف‌گیری این پروتئین‌ها به بافت‌های خاص گیاهان تراریخته راهی دیگر جهت حفاظت آن‌ها در مقابل تجزیه می‌باشد، ضمن این‌که دُز مصرفی آن‌ها نیز بایستی مورد توجه قرار گیرد (Daniell *et al*., 2001).

۳- امکان تولید انبوه پروتئین‌های مورد نظر وجود دارد. تخمین زده می‌شود که میزان تولید پروتئین‌ها در گیاهانی نظیر توتون، سویا و یونجه بیش از ۱۰۰ کیلوگرم به ازای هر هکتار باشد (Maliga, 2004).

[1] Bioencapsulation

٤- امکان بیان پروتئین مورد نظر در قسمت خاصی از گیاه نظیر برگ، ریشه، دانه و یا اندامک خاصی (نظیر کلروپلاست و میتوکندری) وجود دارد (Daniell *et al.*, 2002).

٥- خطر بیماری‌های مشترک و آلودگی محصول پروتئینی به عوامل بیماریزایی نظیر ویروس نقص ایمنی ذاتی[1]، هپاتیت و یا سموم بالقوه خطرناک وجود ندارد.

٦- برخلاف باکتری‌ها، به دلیل تشابه بالای گیاهان با انسان (به دلیل یوکایورتی بودن هر دو) گیاهان می‌توانند پروتئین‌های پیچیده را در شکل صحیح خود تولید کنند (Schillberg *et al*., 2002).

امروزه تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی برای این منظور استفاده شده‌اند که از آن جمله می‌توان به گوجه‌فرنگی، موز، برنج، ذرت، گندم، هویج، سویا، نخود فرنگی، سیب‌زمینی، کاهو و یونجه اشاره کرد. طیف وسیعی از محصولات می‌تواند درگیاهان تولید شوند، اما هر کدام از این محصولات شرایط خاص خود را به منظور تولید نیاز دارد. انتخاب گونه‌های میزبان با نوع پروتئین مورد نیاز و همچنین شکل مصرفی آن پروتئین در ارتباط است (Daniell *et al*., 2001).

در سلول‌های گیاهی پروتئین‌های نوترکیب می‌توانند به واحدهای زیر سلولی متفاوت، نظیر سیتوزول، آپوپلاست، شبکه آندوپلاسمی، کلروپلاست و یا واکوئل هدف‌گیری شوند. انتخاب صحیح واحد زیرسلولی جهت بیان پروتئین نوترکیب، نقش مهمی در میزان تولید پروتئین‌های هترولوگ دارد (Karg and Kallio, 2009). تراریخته نمودن اندامک‌ها، جایگزین انتقال هسته‌ای ژن می‌باشد. پیشرفت‌های اخیر در تراریختی کلروپلاست منجر به بیان پلاستیدی واکسن‌های چند واحدی و آنتی‌بادی‌های نوترکیب شده است. بیان پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست در مقایسه با انتقال هسته‌ای

[1] Human immunodeficiency virus (HIV)

ژن دارای مزایایی از جمله، سطوح بالای بیان و محدود نگه داشتن ژن انتقال یافته می‌باشد (Stoger *et al.*, 2002). با این حال، کلروپلاست ممکن است به موجب شکل تغییرات پس از ترجمه مشابه با باکتری، برای تولید تعداد زیادی از آنتی‌ژن‌های پستانداران مناسب نباشد (Tiwari *et al.*, 2009). در واقع در مباحث انتقال ژن‌های بیانی در کشاورزی ملکولی[1]، بررسی بیان ژن از نظر کمی و کیفی بسیار مهم و اساسی است، زیرا به دست آوردن محصول ژن نوترکیب در قالب پروتئین، از هدف‌های اصلی همسانه‌سازی و انتقال ژن محسوب می‌شود و پس از این پروژه‌ها قطعا بیان ژن نوترکیب، مورد بررسی قرار می‌گیرد. ژن پروانسولین انسانی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی تربیت مدرس توسط تیم تحقیقاتی دکتر جلالی در وکتور کلروپلاستی pKCZ همسانه‌سازی و به روش تفنگ ژنی به کلروپلاست گیاه توتون انتقال داده شده است. در این پروژه هدف، انجام حداقل سه دور باززایی و انتخاب گیاهان تراریخته بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین می‌باشد. همچنین بررسی گیاهان تراریخته در سطوح DNA، RNA و بررسی تولید پروتئین پروانسولین با روش‌های الیزا، بلات نقطه‌ای و وسترن بلات از دیگر اهداف این پروژه می‌باشد.

[1] Molecular farming

فصل دوم

بررسی منابع