

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۰۴۰۹۷ ✓

دانشگاه پیام نور - کتابخانه مرکزی
پشتی مقررات

شماره ثبت	GH
شماره سند	۳۲۴
تاریخ ثبت	۸/۱۲/۷۸

دانشکده : پیام نور مرکز تهران

گروه: زیست شناسی

پایان نامه:

بیان ژن هورمون رشد انسانی GH به صورت موقت در گیاه یونجه
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

رشته: زیست شناسی علوم گیاهی

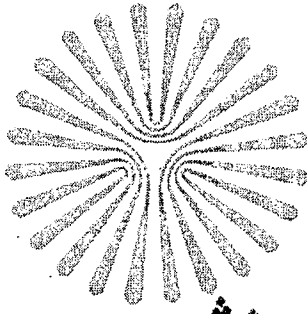
نام مولف: هاله حقیقی

اساتید راهنما: خانم دکتر هاله هاشمی سهی و خانم دکتر مه لقا قربانلی

۱۳۸۷ / ۲ / ۱۵

ماه و سال انتشار: بهمن ۱۳۸۴

۱۰۴۰۹۷



دانشگاه پیام نور

تصویب نامه

پایان نامه تحت عنوان

بیان ژن GH هورمون رشد انسانی به صورت موقت در گیاه یونجه

درجه ارزشیابی: عالی

نمره: ۲۰

تاریخ دفاع: 84/11/4

اعضای هیات داوران:

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
1- خانم دکتر قربانلی	استاد راهنما	استاد	
2- خانم دکتر هاشمی	استاد راهنمای همکار	استاد	
3- خانم دکتر منفرد	استاد داور داخلی	استاد	
4- آقای دکتر عصری	استاد داور خارجی	استاد	
5- آقای دکتر حاج حسینی نماینده گروه			

تقدیر و تشکر:

سپاس از آن پروردگاری است که راه و روش درست زیستن را به ما آموخت.
از استاتید ارجمند خانم دکتر هاله هاشمی سهی و خانم دکتر مه لقا قربانلی،
که با کمکهای بی دریغشان من را در انجام این تحقیق یاری نموده اند
سپاسگزارم.

با تشکر فراوان :

از مادر عزیز و مهربانم خانم فاطمه فرزندی که در تمام مراحل دشوار صمیمانه یاریم کرده و از هیچ کوششی در این راه دریغ ننموده از صمیم قلب تشکر و قدردانی نموده و موفقیت روز افزون ایشان را آرزومندم و همینطور از کمکهای بی دریغ همسر مهربانم آقای عیسی تمیمی در تنظیم این رساله صمیمانه تشکر می نمایم و از صمیم قلب توفیق روز افزون ایشان را خواهانم.

با تشکر فراوان :

از خانم عصمت جورابچی کارشناس محترم پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و خانم زهرا مقدسی جهرمی و تمامی دوستان و کارکنان گرامی پژوهشگاه مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که با همکاری صمیمانه شان مرا در انجام این پروژه یاری نمودند.

تقدیم به:

اساتید ارجمندم خانمها دکتر مه لقا قربانلی و خانم دکتر هاله هاشمی سهی
که تحصیل علم در محضر ایشان همواره موجب افتخار و مباهات من است.

تقدیم به روان پاک پدرم :

« که کلام دلنشین و نگاه مهربانش همیشه در خاترم زنده است. »

تقدیم به مادر عزیزم :

« به پاس گذشت و فداکاری بیکرانش و به پاس تمام کمکهای بی دریغش »

تقدیم به همسر مهربانم:

« که الگوی صداقت و بردباریست »

تقدیم به یگانه میوه بهشتی زندگانیم، هومان :

« به خاطر محبت و صبر و شکیبایی اش »

فهرست مطالب

عنوان صفحه

- ۱ چکیده
- ۳ مقدمه

بخش اول: بررسی منابع

- ۶ ۱-۱-گیاه یونجه
- ۶ ۱-۱-۱-تاریخچه
- ۶ ۱-۱-۲-ریخت شناسی و محل رویش
- ۸ ۱-۱-۳-ترکیبات شیمیایی یونجه (Brean et al 1993)
- ۸ ۱-۱-۴-خواص و موارد مصرف یونجه
- ۹ ۱-۱-۵-مضارف غذایی یونجه
- ۹ ۱-۱-۶-مضارف دارویی و درمانی یونجه
- ۱۰ ۱-۲-کشاورزی مولکولی پروتئین های دارویی
- ۱۰ ۱-۲-۱-مقدمه ای بر کشاورزی مولکولی
- ۱۳ ۱-۲-۲-گیاهان به عنوان یک سیستم تولیدی و بیوراکتور
- ۱۶ ۱-۲-۳-تولید آنتی ژن ها و واکسن های خوراکی در گیاهان

- ۲۰ ۳-۱-استراژی های بیان در گیاه
- ۲۱ ۳-۱-۱-بیان موقت ژن در گیاه
- ۲۵ ۳-۱-۲-کات مهم برای بیان دارو ها در گیاهان
- ۲۵ ۳-۱-۳-پتیمایز کردن بیان در سطح ژن
- ۲۵ ۳-۱-۴-بهینه کردن (Optimization) تولید آنتی بادی در سطح گیاهان تراریخت
- ۲۶ ۳-۱-۷-هدف از این تحقیق و سابقه آن در کشور

بخش دوم: مواد و روشها

- ۲۸ ۲-۱-ساختن سازه حاوی ژن هورمون رشد انسانی
- ۲۸ ۲-۱-۱-۱-پلاسمید PRTL
- ۲۹ ۲-۱-۲-ناقل دو تایی pBin19
- ۲۹ ۲-۱-۳-کلونینگ در ناقل PRTL
- ۳۳ ۲-۱-۴-نتایج کلونینگ در ناقل PRTL
- ۳۵ ۲-۲-کشت گیاه در خاک
- ۳۶ ۲-۳-کشت شبانه آگروباکتریوم
- ۳۷ ۲-۴-اندازه گیری OD
- ۳۷ ۲-۵-تهیه سوسپانسیون حاوی آگروباکتریوم
- ۳۹ ۲-۶-آگرواینفیلتریشن

۴۱	۷-۲ طراحی آزمایش
۴۲	۸-۲ استخراج پروتئین به روش لاملی
۴۳	۹-۲ اندازه گیری میزان بیان هورمون رشد انسانی توسط کیت الیزا
۴۵	۱۰-۲ تهیه مینی ژل DS-PAGE
۴۶	۱۱-۲ دیالیز پروتئین
۴۸	۱۲-۲ رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE
۴۸	۱۳-۲ آزمون وسترن بلات
۵۱	۱۴-۲ سنجش پروتئین کل به روش براد فورد

بخش سوم : نتایج و بحث

۵۴	۱-۳ نتایج حاصل از کیت الیزا
۵۵	۲-۳ نتایج حاصل از لکه گذاری وسترن
۵۵	۳-۳ نتایج حاصل از سنجش پروتئین به روش براد فورد
۶۶	۴-۳ بحث

پیوست ها

۶۹	ضمیمه ۱
۷۰	ضمیمه ۲
۷۱	ضمیمه ۳
۷۴	ضمیمه ۴
۷۸	ضمیمه ۵
۸۱	ضمیمه ۶
۸۴	ضمیمه ۷
۸۸	ضمیمه ۸
۸۹	ضمیمه ۹

منابع و مأخذ

- ۹۰ فهرست منابع فارسی
- ۹۱ فهرست منابع انگلیسی
- ۹۷ چکیده انگلیسی

فهرست جداول

- ۱۵ جدول ۱-۱
- ۲۴ جدول ۲-۱
- ۵۷ جدول ۱-۳
- ۵۸ جدول ۲-۳
- ۵۹ جدول ۳-۳
- ۶۰ جدول ۴-۳
- ۶۱ جدول ۵-۳

فهرست نمودارها

- ۶۲ نمودار ۱-۳
- ۶۲ نمودار ۲-۳
- ۶۳ نمودار ۳-۳
- ۶۳ نمودار ۴-۳
- ۶۴ نمودار ۵-۳
- ۶۴ نمودار ۶-۳
- ۶۵ نمودار ۷-۳
- ۶۵ نمودار ۸-۳

فهرست اشکال

۷	شکل ۱-۱
۲۳	شکل ۲-۱
۲۸	شکل ۱-۲
۲۹	شکل ۲-۲
۳۳	شکل ۳-۲
۳۴	شکل ۴-۲
۳۴	شکل ۵-۲
۳۵	شکل ۶-۲
۳۵	شکل ۷-۲
۴۰	شکل ۸-۲
۴۱	شکل ۹-۲
۴۴	شکل ۱۰-۲
۵۰	شکل ۱۱-۲

چکیده

با توجه به اهمیت هورمون رشد انسانی در درمان دارویی بسیاری از نارسائیهای ناشی از کمبود آن تولید این هورمون بصورت نو ترکیب در داخل و خارج کشور مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر از روشها و موجودات مختلفی برای تولید مولکولهای نو ترکیب دارویی که از اهمیت تجاری برخوردار هستند استفاده می گردد. یافتن جایگزینی مناسب برای تولید مولکولهای نو ترکیب از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در دهه اخیر تولید پروتئین های نو ترکیب دارویی در گیاهان بخصوص انواعی از آنها که ارزش تغذیه ای دارند، همانند یونجه مورد توجه قرار گرفته است. مصرف خوراکی و دارویی، تولید بالای محصول، مفید بودن برای تولید واکسن حیوانی، انتشار وسیع، داشتن N-گلیکان بالا و پردازش صحیحی از پروتئین های نو ترکیب (Beran et al 1993) و بیان موقت ژن در گیاه یونجه از جمله خصوصیات مهم این گیاه می باشد که می توان به عنوان یک گیاه مناسب برای تولید پروتئین نو ترکیب از آن استفاده کرد. به عنوان مثال سلولهای گیاهی توانایی پردازش صحیحی از پروتئین نو ترکیب را دارند، بطوریکه می توانند در مراحل پس از ترجمه اعمالی نظیر اتصال قندهای انتهایی گلیکوزیلاسیون و تشکیل باندهای دی سولفیدی را به شکل صحیح تری نسبت به سایر سیستمها نظیر باکتریایی یا قارچی انجام دهند. سرعت تولید بالای پروتئین نو ترکیب در زمان کوتاه توسط سلولهای گیاهی انجام می گیرد.

هدف: هدف آن است که پتانسیل گیاه یونجه، بعنوان یک گیاه زود رشد و به عنوان کارخانه تولید کننده پروتئین نو ترکیب مورد بررسی قرار گیرد.

روش تحقیق: با استفاده از روش آگرواینفیلتریشن^۱ (انتقال ژن تحت خلاء توسط آگروباکتریوم) آگروباکتریوم حاوی وکتور بیانی هورمون رشد انسانی به بافت برگ های سالم یونجه با زمانهای مختلف ۵ و ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ و ۳۰ و ۳۵ دقیقه وارد شد. میزان بیان پروتئین در برگ ها با استفاده از کیت الیزا سنجش هورمون رشد و روش لکه گذاری وسترن (Western blot) اندازه گیری شد.

یافته ها: بهترین جواب مربوط به برگ جوان گیاه یونجه که پس از ۳۰ دقیقه آگرواینفیلتریشن به مدت سه روز در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی/۱۶ ساعت روشنایی با میزان ۶۰۰۰-۸۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵°C نگهداری شد. بود، میزان پروتئین هورمون رشد انسانی تولیدی به میزان ۱/۵۳٪ کل پروتئین استخراج شده از گیاه بود.

^۱ Agro-infiltration

نتیجه گیری: گیاه یونجه می تواند به عنوان کارخانه سنتز تولید پروتئین نو ترکیب برای مثال پروتئینهای تشخیصی و همینطور توانایی بیان ژن بکار رود. این روش بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته قابل انجام است و از نظر اقتصادی میتواند در مورد تولید پروتئین های نو ترکیب با مقادیر در حد میلی گرم مقرون به صرفه باشد. از مزایای برتر این سیستم (سامانه) این است که بیان هر ژنی را قبل از اینکه تراریختی بر روی گیاهان بطور ثابت انجام شود نشان می دهد.

گل واژگان: یونجه-پروتئین نو ترکیب-آگرواینفیلتریشن-هورمون رشد-بیان موقت ژن

انتقال موفقیت آمیز ژن به ژنوم های گیاهی برای اولین بار در دهه ۱۹۸۰ گزارش شده است (Drean et al 1993). در حال حاضر گیاهان به عنوان یکی از منابع وسیع برای تولید پروتئین نو ترکیب مورد توجه ویژه زیست شناسان قرار گرفته اند و پروتئین های دارویی نو ترکیبی که از گیاهان بدست آمده، در حال رسیدن به مرحله نهایی تکامل تکنیکی و ورود به بازار می باشد. در طی سالها در این مسیر به میزان زیادی پیشرفت حاصل شده است (ahl and Winter 1995, Palus Kp 1995) و پروتئینهای نو ترکیب می توانند در تشخیص عامل های بیماری، واکسن ها و تولید داروهای خاص نو ترکیب استفاده شوند (Rees, ap. 1995). و این امر تقاضای زیادی را برای تولید انبوه پروتئین های نو ترکیب بوجود می آورد. بطور سنتی تولید پروتئین تجاری بر اساس تخمیر میکروبی و سلول پستانداران انجام می شود، اما این سیستم ها از لحاظ قیمت و پایداری و ایمنی مقرون به صرفه نیستند و می بایست در مورد آنها تحقیق بیشتری صورت بگیرد (Fischer et al. 2004). به این دلیل گیاهان همچنان یکی از امید بخش ترین زمینه ها برای تولید انبوه پروتئینهای مورد نظر، برای زیست شناسان آینده خواهند بود. سرمایه گذاری روی تحقیقات مهندسی ژنتیک گیاهی در بخش های خصوصی و دولتی به این دلیل است که گیاهان مورد مناسبی برای استفاده صنعتی در سیستم های مختلف شناخته شده اند (Sala et al. 2003). در دهه اخیر تولید پروتئینهای نو ترکیب دارویی در گیاهان بخصوص آنهایی که دارای ارزش تغذیه ای هستند مورد توجه قرار گرفته است به نحوی که «نسل دوم گیاهان تراریخت» به آنها اطلاق شده است. روشهای مختلفی جهت معرفی و ادغام ژنهای مورد نظر در قسمت های مختلف گیاه وجود دارد که در این راستا تعدادی از مولکولهای پروتئینی شامل منابع مختلف باکتریایی (Fraley et al 1983)، حیوانی و قارچی و سایر گیاهان می باشد. هورمون رشد خود نیز یکی از انواع پروتئینها است که بیان آن در گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است. گیاهان در مقیاس کشاورزی ارزش واقعی تولید پروتئین نو ترکیب را بیان می کنند و در ضمن خطر آلودگی با اندوتوکسین ها و عامل های بیماریزای انسانی را ندارند (Fischer and Twyman 2003, Majk et al 1999, Gidding et al 2000, Emans. 2000). از مزایای دیگر پروتئین های نو ترکیب این است که واکسن در اندام های خوردنی گیاه می تواند بیان شود (Sala et al. 2003). با انتقال ژن می توان مسیرهای متابولیسی سلولهای گیاهان را بمنظور تولید یک فرآورده مفید با ارزش شیمیایی یا دارویی را افزایش داد (Rees, ap. 1995). کشت وسیع گیاهان بخصوص در کشورهای در حال توسعه یکی دیگر از دلایل

اهمیت تولیدمولکولهای نوترکیب داروئی درگیاه بعنوان وسیله ای ارزان درجهت تولیدمی باشد. نهایتاً داشتن فرم صحیح پروتئین و تغییرات پس از ترجمه در سلولهای یوکاریوتیک گیاهی یکی دیگر از دلایل انتخاب آنها می باشد. پیش بینی می شود که این تکنولوژی نقش بسیار عمده ای در بهداشت و سلامتی بشر داشته باشد که این امر با تولید ترکیبات داروئی مطمئن و در دسترس میسر خواهد بود (Rainer 1999, Ma J 2003). اولین تولید پروتئین های نوترکیب داروئی در گیاه در سال ۱۹۸۶ در گیاهان تنباکو و کالوس آفتابگردان انجام گرفت در این تحقیق نشان داده شد که پروتئین نوترکیب هورمون رشد انسانی (hGH) مثل یک پروتئین همجوش (فوزیون) می تواند بیان شود (Barata et al 1986). از آن به بعد یک سیستم متمایز، برای تولید داروها استفاده شده است (Fischer and Emans 2000, Stocer et al 2002). سیستم تولید پروتئین نوترکیب در یونجه گسترش داده شده است (Fischer and Schilberg 2004).

دلیل اصلی انتخاب برگ یونجه (*Medicago sativa*) به این علت است که این گیاه از ارزش اقتصادی برخوردار بوده دارای مشخصات مطلوب زیادی جهت کشاورزی رادار می باشد (Narvaez-Vasques et al 1999). برای مثال حجم (Biomass) انبوه تولید آن، میتواند عامل مهمی در تولید پروتئین های نوترکیب داروئی در آن باشد. هم چنین این گیاه، دارای مواد ا زته و ویتامین های A, C, E, K می باشد و اهمیت فراوان در تغذیه اطفال دارد. بعلاوه به علت دارا بودن مواد آهکی نسبتاً زیاد، در راشتیسم و تأمین استخوان مخصوصاً در حیوانات جوان اثر مفید دارد (زرگری علی ۱۳۶۸, Carol et al 1996). و در ضمن سطح کلسترول افراد مبتلا به چربی خون را طبیعی می کند (زرگری علی ۱۳۶۸).



بخش اول

بررسی منابع

۱- گیاه یونجه

۱-۱-۱- تاریخچه

در تاریخچه استفاده از یونجه چنین ثبت گردیده است که پرورش این گیاه به منظور تهیه علوفه برای چهارپایان و اسب های سلطنتی در زمان های بسیار قدیم معمول بوده است (زرگری-علی-۱۳۶۸). دانه آن توسط دا ریوش پادشاه ایران در سال ۴۸۶-۵۵۰ سال پیش از میلاد مسیح به یونان (Horn et al 1996) و دو قرن بعد از یونان به ایتالیا انتقال یافته و تدریجاً در منطقه مدیترانه مانند فرانسه و غیره توسعه پیدا کرد (زرگری-علی-۱۳۶۸). عرب ها از یونجه جهت تغذیه اسب هایشان جهت قویتر و سریعتر شدن، آنها استفاده می کردند (Marderosian Arader 2000). یونجه به مصارف تغذیه انسان هم می رسد مانند آنکه در چین، روسیه، امریکا و افریقای شمالی از آن بجای اسفناج استفاده بعمل می آورند (Marderosian 2000). همینطور دانه های یونجه برای هزاران سال خورده می شدند (زرگری-علی-۱۳۶۸).

در ضمن در مقادیر کم طعم دهنده غذا یی است (Carol et al 1996).

۱-۱-۲- ریخت شناسی و محل رویش

یونجه (مظفریان-ولی الله ۱۳۷۵) (شکل ۱) با نام علمی *Medicago sativa* از تیره پروانه واران Papilionaceae جنس *Medicago*، گونه ساتیوا (*sativa*) می باشد.

نام های دیگرش شامل: لوسیننه (Lucenne) داروی بوفالو (Buffalo Herb)، داروی بنفش (Purpule Herb)، Purpule Medick, Purpule Medicle (Gruen Wald et al 1998) نام سبزی آلفا آلفا^۲ به معنی پدر غذا می باشد (Marderosian 2000). گیاهی علفی، چند ساله به ارتفاع ۴۵ تا ۱۰۰ سانتی متر و دارای برگهای مرکب از سه برگچه دنداندار است. گلهای آن درشت به رنگ آبی، مایل به بنفش و یا زرد و مجتمع و به صورت خوشه درازست. میوه اش به صورت نیام داسی شکل و پیچ خورده می باشد (زرگری ۱۳۶۸ و قهرمان ۱۳۶۲ و Gruen 1998_walled et al 1998)، ریشه بسیار عمیقی دارد و ریشه آن تا سه متر بداخل زمین نفوذ می کند و بنابراین منبع ویتامینهایی است که از خاک می گیرد. قسمت مورد استفاده آن قسمت های هوایی گیاه می باشد (Carol 1996). یونجه در گلخانه ۱۰ بار در هر سال تکثیر پیدا می کند و برای ۵ سال نگهداری می شود (Barata et al 1986).

² Alfa alfa

زمان برداشت آن تابستان است (Chevallier, Andrew. 1996). یونجه در نواحی مختلف ایران شامل: بلوچستان، ارتفاعات تفتان، دیلمان، ارومیه، مسجد سلیمان، اصفهان و کردستان و بخشهای شمالی کشور پراکندگی دارد (قهرمان-احمد ۱۳۶۲). بعلاوه در بعضی مناطق بحالت وحشی یافت می گردد (Marderosian 2000) و در نواحی معتدله شمال غربی آسیا، اروپا، امریکا و شمال افریقا می روید (D' Amelio. Franks. 2000).



شکل (۱-۱) یونجه (*Medicago sativa*) قرن هاست که جهت تغذیه کشت می شود و خواص

دارویی دارد (Beran et al 1993).