دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی

رساله

برای دریافت درجه دکتری (Ph.D) در رشته اصلاح نباتات

عنوان

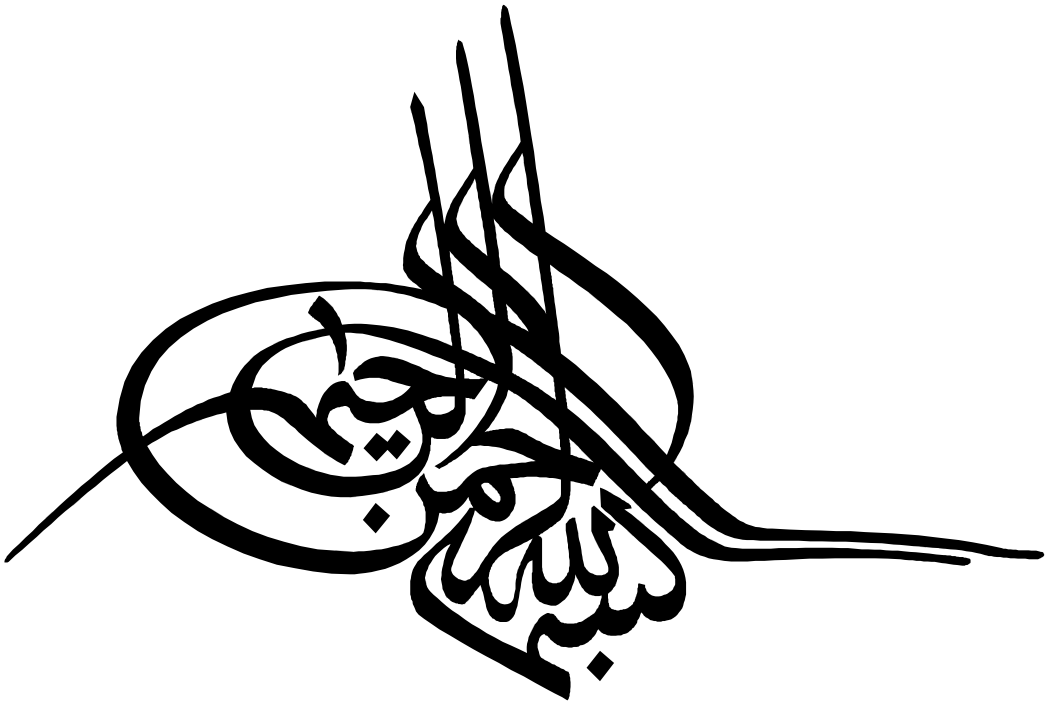
همسانه‌سازی، انتقال و بررسی بیان ژن پروانسولین انسانی در گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.)

مهدی محب‌الدینی

استاد راهنما

دکتر مختار جلالی جواران

تیر ۱۳۹۰


بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای مهدی محب الدینی رساله ۱۸ واحدی خود را با عنوان:

همسانه سازی، انتقال و بررسی بیان ژن پروانسولین انسانی در گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.)

در تاریخ ۱۳۹۰/۴/۱۵ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر مختار جلالی جواران	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	-	-	
۳- استاد مشاور اول	دکتر فریدون مهبودی	دانشیار	
۴- استاد مشاور دوم	دکتر هوشنگ علیزاده	دانشیار	
۵- استاد ناظر	دکتر محمد رضا زمانی	استاد	
۶- استاد ناظر	دکتر محمد علی ملبوبی	دانشیار	
۷- استاد ناظر	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۸- استاد ناظر	دکتر احمد معینی	دانشیار	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر رضا قلی میرفخرایی	استادیار	

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، مبیّن 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:

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 رسالهٔ دکتری نگارنده در رشته **اصلاح نباتات** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر **مختار جلالی جواران**، مشاورهٔ جناب آقای دکتر **فریدون مهبودی** و مشاورهٔ جناب آقای دکتر **هوشنگ علیزاده** 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 **مهدی محب‌الدینی** دانشجوی رشته **اصلاح نباتات** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: مهدی محب‌الدینی

تاریخ و امضاء: ۹۰/۴/۲۰

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

مقدمه : با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان ها 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 پژوهش های علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرح های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها، رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می باید 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 پایان نامه و رساله منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه، رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه، رساله و تمامی طرح های 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.

نام و نام خانوادگی: مهدی محب‌الدینی

تاریخ و امضاء: ۹۰/۴/۲۰

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی

رساله

برای دریافت درجه دکتری (Ph.D) در رشته اصلاح نباتات

همسانه‌سازی، انتقال و بررسی بیان ژن پروانسولین انسانی در گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.)

مهدی محب‌الدینی

استاد راهنما

دکتر مختار جلالی جواران

اساتید مشاور

دکتر فریدون مهبودی دکتر هوشنگ علیزاده

تیر ۱۳۹۰

تقدیم به

رهپویان دانش

و

خانواده عزیزم

سپاس و قدردانی

با استعانت از درگاه ایزدمنان بدین وسیله بر خود لازم می‌دانم از کلیه عزیزانی که بنده را مورد الطاف خویش قرار داده و از هیچ‌گونه مساعدت و همفکری در طول انجام این رساله دریغ ننموده‌اند کمال تقدیر و تشکر را داشته باشم و از خداوند باری‌تعالی برای این عزیزان صحت و سلامت وجود و موفقیت در تمامی مراحل زندگی را خواستار باشم.

استاد راهنمای بسیار عزیز و گرامی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران که از زمان آغاز تحقیق بنده را مورد لطف قرار داده و در تمام مراحل مختلف بنده را راهنمایی نمودند. اساتید مشاور عزیز جناب آقای دکتر فریدون مهبودی از انستیتو پاستورکه در فراهم نمودن ژن پروانسولین مساعدت نمودند و از جناب آقای دکتر هوشنگ علیزاده به خاطر کمک‌های ایشان در انجام رساله که بنده را مورد لطف خویش قرار دادند.

کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی سرکار خانم مهندس آزموده که در امر انجام کارهای آزمایشگاهی، کمک حال اینجانب بودند و همچنین از کارشناس محترم آزمایشگاه اصلاح نباتات جناب آقای مهندس ایری قدردانی می‌گردد.

از دوست بسیار عزیزم جناب آقای ناصر صباغ‌نیا که در مراحل مختلف یار و یاور بنده بودند سپاسگزاری می‌نمایم. از دوستان عزیزم آقایان حمید رجبی معماری، حامد اژدری، حسین خسروی، آرش رزمی، بابک لطیف، پیام پورمحمدی، محمد مجدی، اسد معصومی اصل، محمد سلیم‌پور و خانمها رزمی و عبدلی‌نسب که در مراحل مختلف انجام تحقیق به بنده کمک نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

دیابت بیماری است که بدن نمی‌تواند انسولین تولید کند یا به درستی از آن استفاده کند. اگرچه انسولین عموماً در باکتری یا مخمر برای استفاده تجاری تولید می‌شود اما در حال حاضر تحقیقات بر روی روش‌های دیگر تولید از جمله تولید پروتئین انسولین در گیاهان متمرکز شده است. گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) یک گیاه مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب و بویژه واکسن‌های خوراکی می‌باشد. این گیاه یکی از عمده‌ترین سبزی‌های برگی بوده و متعلق به خانواده Asteraceae می‌باشد. در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای مخصوص و روش PCR، ژن پروانسولین انسانی تکثیر شد. ژن تکثیر شده از روی ژل جداسازی و با آنزیم‌های خاص برش داده شد و در ناقل *pCAMBIA1304* همسانه‌سازی گردید. ناقل ساخته شده با روش‌های مختلف تأیید گردید. مهندسی ژنتیک کاهو به یک روش موثر و قابل اتکا کشت بافت نیاز دارد. برای این منظور، عوامل مختلف موثر بر باززایی کوتیلدون‌های کاهو از قبیل ژنوتیپ، سن ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بررسی شدند. بالاترین میزان کالوس‌زایی در غلظت ۲/۷ میکرومولار NAA و ۴/۴ میکرومولار BA بدست آمد. بالاترین میزان نوساقه‌زایی در غلظت‌های کم BA اتفاق افتاد. شرایط بهینه‌ای برای تراریخته‌سازی از هم‌کشتی نمونه‌های کوتیلدونی با اگروباکتریوم در محیط MS بدون هیچ گونه هورمون رشدی به مدت ۴۸ ساعت بدست آمد. بعد از مرحله هم‌کشتی، نمونه‌های کوتیلدونی روی محیط کشت انتخابگر حاوی هیگرومایسین و سفوتاکسیم کشت شدند. بعد از انتقال کوتیلدون‌ها به محیط انتخابگر و پس از چند بار واکشتی ریزنمونه‌ها، گیاهان کاهوی تراریخت بدست آمدند. با استفاده از آنالیز PCR و Southern Blotting، حضور قطعه T-DNA حاوی ژن پروانسولین انسانی در ژنوم کاهو اثبات گردید و همچنین انجام RT-PCR نسخه‌برداری از روی این ژن را تأیید نمود. آنالیز گیاهان تراریخته در سطح پروتئین با بهره‌گیری از آزمون‌های ELISA و ایمونوبلاتینگ وجود پروتئین در گیاهان تراریخت را تأیید کردند. در ادامه این پروژه انتقال ژن پروانسولین به هسته گیاه توتون و کلروپلاست آن انجام شده است که مراحل آنالیز گیاهان توتون تراریخت شده هسته‌ای و کلروپلاستی در حال انجام است.

کلمات کلیدی: کاهو، *Lactuca sativa* L.، دیابت، پروانسولین انسانی، اگروباکتریوم، پروتئین‌های نوترکیب، بیوراکتور

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۲

۱- بررسی منابع ۷

۱-۱- زراعت مولکولی ۱۱

۱-۲- روش‌های انتقال ژن ۱۳

۱-۲-۱- طبقه‌بندی اگروباکتریوم‌ها ۱۳

۱-۲-۲- ناقل‌های مبتنی بر اگروباکتریوم ۱۳

۱-۲-۳- ناقلین تلفیق مشترک ۱۴

۱-۲-۴- ناقلین دوتایی (ناقلین جفتی) ۱۴

۱-۲-۵- تاریخچه انتقال ژن توسط اگروباکتریوم به گیاهان ۱۵

۱-۲-۶- روش‌های تراریختی با استفاده از اگروباکتریوم ۱۶

۱-۲-۶-۱- آلوده کردن گیاهان زخمی ۱۶

۱-۲-۶-۲- کشت توأم ۱۶

۱-۲-۶-۳- روش دیسک برگی ۱۷

۱-۲-۷- اساس مولکولی انتقال ژن بواسطه اگروباکتریوم ۱۷

۱-۲-۸- نقش پروتئین‌های Vir فعال در انتقال ژن توسط اگروباکتریوم به سلول گیاهی ۱۹

۱-۲-۸-۱- پروتئین‌های VirA و VirG ۱۹

۱-۲-۸-۲- پروتئین‌های VirD4 و VirB ۱۹

۱-۲-۸-۳- پروتئین‌های VirD2 و VirE2 ..... ۲۰

۱-۲-۸-۴- پروتئین‌های VirF ۲۱

۱-۲-۸-۵- درج T-DNA در ژنوم ۲۱

۱-۲-۹- مزایا و معایب استفاده از روش اگروباکتریوم برای انتقال ژن به گیاهان دو لپه ۲۲

۱-۳- تغییرات پس از ترجمه ۲۴
۱-۴- میزبان‌های بیانی گیاهی ۲۵
۱-۴-۱- تولید پروتئین‌های نوترکیب در پلاستیدها ۲۷
۱-۵- مقبولیت زراعت مولکولی ۳۱
۱-۶- دیابت ۳۱
۱-۷- انسولین ۳۲
۱-۸- بررسی امکان مصرف خوراکی انسولین ۳۴
۱-۹- گیاه کاهو ۴۰
۱-۹-۱- کشت بافت گیاه کاهو ۴۱
۲- مواد و روش‌ها ۴۵
۲-۱- مواد شیمیایی ۴۵
۲-۲- باکتری‌ها و ناقل‌ها ۴۵
۲-۲-۱- ذخیره باکتری ۴۶
۲-۲-۲- محیط کشت باکتری ۴۶
۲-۲-۳- آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده ۴۷
۲-۳- مواد و وسایل مورد نیاز برای کشت بافت ۴۸
۲-۳-۱-تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۴۸
۲-۳-۱-۱- سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده برای محیط‌های مختلف ۴۹
۲-۴- تجزیه‌های آماری ۵۱
۲-۵- ژن پروانسولین ۵۱
۲-۶- طراحی آغازگرها ۵۲
۲-۷- استخراج DNA ژنومی از گیاه کاهو ۵۴
۲-۷-۱- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA استخراجی ۵۵
۲-۸- تکثیر و جداسازی ژن پروانسولین انسانی ۵۵

۲-۸-۱- جداسازی محصول PCR از ژل آگارز ۵۶
۲-۹- استخراج ناقل هدف به روش MINI-PREPARATION ۵۶
۲-۱۰- هضم آنزیمی ناقل بیانی گیاهی *pCAMBIA1304* ۵۷
۲-۱۱- هضم آنزیمی محصول PCR ژن پروانسولین انسانی ۵۸
۲-۱۲- همسانه‌سازی ژن پروانسولین انسانی در ناقل بیانی گیاهی *pCAMBIA1304* ۵۸
۲-۱۳- انتقال ناقل حامل ژن پروانسولین انسانی به باکتری E. COLI ۵۹
۲-۱۴- انجام کلونی PCR بر روی کلون‌های ایجاد شده ۶۰
۲-۱۵- هضم آنزیمی ناقل حامل ژن پروانسولین انسانی ۶۰
۲-۱۶- توالی‌یابی ژن پروانسولین همسانه شده در ناقل *pCAMINS* ۶۱
۲-۱۷- انتقال ناقل *pCAMINS* حامل ژن پروانسولین به اگروباکتریوم ۶۱
۲-۱۸- تایید ناقل حامل ژن پروانسولین در اگروباکتریوم ۶۲
۲-۱۹- کشت بافت و انتقال ژن به گیاه کاهو ۶۲
۲-۱۹-۱- مواد گیاهی و آماده‌سازی بذور ۶۲
۲-۱۹-۲- کشت اگروباکتریوم ۶۳
۲-۱۹-۳- آماده‌سازی نمونه گیاهی ۶۳
۲-۱۹-۴- آماده‌سازی اگروباکتریوم ۶۴
۲-۱۹-۵- تلقیح ریزنمونه‌های گیاهی و هم‌کشتی ۶۴
۲-۱۹-۶- باززایی گیاهان تراریخت ۶۵
۲-۱۹-۷- انتقال گیاهان به پرلیت و سازگار نمودن گیاهان باززایی شده ۶۶
۲-۲۰- بررسی گیاهان تراریخت ۶۷
۲-۲۰-۱- آزمون گیاهان تراریخت با استفاده از روش PCR ۶۷
۲-۲۰-۱-۱- آزمون PCR برای ژن مقاومت به هیگرومایسین ۶۷
۲-۲۰-۱-۲- آزمون PCR برای ژن پروانسولین انسانی ۶۷
۲-۲۰-۲- آزمون سادرن بلاتینگ (Southern Blotting) ۶۸
۲-۲۰-۲-۱- تهیه شناساگر (Probes) ۶۹

۲-۲۰-۳- آزمون گیاهان تراریخت در سطح RNA ۷۲
۲-۲۰-۴- آزمون گیاهان تراریخت در سطح پروتئین با استفاده از روش SDS-PAGE ۷۲
۲-۲۰-۴-۱- استخراج پروتئین ۷۳
۲-۲۰-۴-۲- محلول‌های مورد استفاده برای تهیه ژل پلی‌اکریل آمید ۷۴
۲-۲۰-۵- آزمون گیاهان تراریخت در سطح پروتئین با استفاده از روش TAS-ELISA ۷۷
۲-۲۰-۶- آزمون گیاهان تراریخت در سطح پروتئین با استفاده از روش Western Blotting. ۸۰
۳- نتایج و بحث ۸۳
۳-۱- همسانه‌سازی ژن پروانسولین انسانی در ناقل بیانی گیاهی *pCAMBIA1304* ۸۳
۳-۲- نتایج کشت بافت گیاه کاهو ۸۹
۳-۳- سطح موثر هیگرومایسین به عنوان عامل انتخابگر کوتیلدون‌های کاهو ۹۶
۳-۴- نتایج تراریخت نمودن کوتیلدون‌های کاهو با استفاده از اگروباکتریوم ۹۶
۳-۵- سازگاری گیاهچه‌های احتمالاً تراریخت با شرایط محیطی ۹۹
۳-۶- تجزیه و تحلیل مولکولی گیاهان تراریخته ۱۰۱
۳-۶-۱- بررسی گیاهان تراریخته در سطح DNA ۱۰۱
۳-۶-۱-۱- تأیید حضور ژن مقاومت به هیگرومایسین در گیاهان احتمالاً تراریخت کاهو ۱۰۱
۳-۶-۱-۲- تأیید حضور ژن پروانسولین انسانی در گیاهان تراریخت ۱۰۳
۳-۶-۲- تأیید حضور ژن پروانسولین انسانی و تعیین تعداد نسخه منتقل شده ۱۰۴
۳-۶-۳- بررسی بیان ژن پروانسولین در سطح RNA در گیاهان کاهوی تراریخت ۱۰۵
۳-۶-۴- بررسی گیاهان تراریخت در سطح پروتئین به روش SDS-PAGE ۱۰۶
۳-۶-۵- بررسی بیان پروتئین پروانسولین انسانی با استفاده از روش TAS-ELISA ۱۰۷
۳-۶-۶- بررسی بیان پروتئین پروانسولین انسانی با استفاده از روش ایمونوبلاتینگ ۱۰۸
۳-۷- بحث و نتیجه‌گیری نهایی ۱۱۰
۳-۸- پیشنهادات ۱۱۵
۴- منابع ۱۱۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- گیاهان استفاده شده برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در شرکت‌های داروسازی..... ۳۰
جدول ۲-۱- نوع و غلظت هورمونی در محیط‌های کشت نوساقه‌زایی دو ژنوتیپ کاهو..... ۴۹
جدول ۲-۲- نوع محیط کشت و سطوح مختلف هورمون NAA برای ریشه‌زایی نوساقه‌های کاهو ۵۰
جدول ۲-۳- برنامه دمایی و تعداد چرخه‌های لازم برای تکثیر ژن پروانسولین انسانی..... ۵۶
جدول ۲-۴- واکنش هضم آنزیمی ناقل *pCAMBI1304*..... ۵۷
جدول ۲-۵- واکنش هضم آنزیمی قطعه ژن پروانسولین انسانی..... ۵۸
جدول ۲-۶- مواد واکنش اتصال ژن پروانسولین انسانی به ناقل بیانی گیاهی *pCAMBIA1304*..... ۵۹
جدول ۲-۷- برنامه دمایی و تعداد چرخه‌های لازم برای تکثیر ژن پروانسولین انسانی..... ۶۸
جدول ۲-۸- مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه ژل پلی‌اکریل آمید برای غلظت‌های مختلف..... ۷۷
جدول ۳-۱- تجزیه واریانس اثر سه فاکتور مختلف بر کالوس‌زایی و نوساقه‌زایی مستقیم کاهو..... ۹۰
جدول ۳-۲- مقایسه میانگین میزان کالوس‌زایی در نمونه‌های کوتیلدونی کاهو..... ۹۱
جدول ۳-۳- مقایسه میانگین میزان نوساقه‌زایی مستقیم در نمونه‌های کوتیلدونی کاهو..... ۹۳
جدول ۳-۴- جدول تجزیه واریانس درصد ریشه‌زایی در جوانه‌های باززایی‌شده کاهو..... ۹۵
جدول ۳-۵- جدول مقایسه میانگین صفت درصد ریشه‌زایی..... ۹۵

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ساختار پروتئین پروانسولین انسانی ۳۳

شکل ۲-۱- نقشه ناقل بیانی گیاهی *pCAMBIA1304* ۴۶

شکل ۳-۱- محصول PCR ژن پروانسولین روی ژل آگارز ۸۳

شکل ۳-۲- برش قطعه ۵۰۰bp ژن پروانسولین از روی ژل و استخراج آن ۸۴

شکل ۳-۳- تخلیص ناقل بیانی گیاهی *pCAMBIA1304* ۸۵

شکل ۳-۴- ناقل *pCAMBIA1304* برش داده شده با آنزیم‌های *Nco*I و *Bst*EII ۸۵

شکل ۳-۵- کلونی PCR بر روی کلون‌های حاصل در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۸۶

شکل ۳-۶- تأیید حضور ژن پروانسولین در ناقل با هضم آنزیمی ۸۷

شکل ۳-۷- سازه *pCAMINS* حاصل از همسانه‌سازی پروانسولین انسانی ۸۷

شکل ۳-۸- مقایسه توالی دو رشته ژن پروانسولین انسانی همسانه‌سازی شده با توالی اصلی ژن..... ۸۸

شکل ۳-۹- تایید حضور سازه حاوی ژن پروانسولین انسانی (*pCAMINS*) در اگروباکتریوم ۸۹

شکل ۳-۱۰- بهترین ناحیه برای نوساقه‌زایی مستقیم بر روی ریزنمونه‌های کوتیلدونی ۹۴

شکل ۳-۱۱- کوتیلدون‌های کاهو بر روی محیط کشت هورمون‌دار ۹۷

شکل ۳-۱۲- قسمت‌هایی از کوتیلدون که ژن مقاومت به هیگرومایسین را دریافت نکرده‌اند..... ۹۷

شکل ۳-۱۳- کوتیلدون‌های تلقیح شده کاهو با اگروباکتریوم..... ۹۸

شکل ۳-۱۴- گیاهچه‌های مقاوم کاهو نسبت به هیگرومایسین بر روی محیط ریشه‌زایی ۹۹

شکل ۳-۱۵- گیاهچه‌های تراریخت احتمالی کاهو..... ۹۹

شکل ۳-۱۶- گیاه کاهو تراریخت احتمالی منتقل شده به گلدان ۱۰۰

شکل ۳-۱۷- گیاه کاهوی احتمالاً تراریخت در مرحله گلدهی ۱۰۱

شکل ۳-۱۸- بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از گیاه کاهو..... ۱۰۲

شکل ۳-۱۹- تأیید حضور ژن مقاومت به هیگرومایسین در گیاهان تراریخت..... ۱۰۲

شکل ۳-۲۰- تأیید حضور قطعه ۵۰۰ bp ژن پروانسولین انسانی در ژنوم کاهو..... ۱۰۳

شکل ۳-۲۱- الگوی دورگ‌گیری سادرن بلاتینگ (Southern Blotting) گیاهان تراریخت.....۱۰۴
شکل ۳-۲۲- انجام RT-PCR بر روی RNA گیاهان تراریخت.....۱۰۶
شکل ۳-۲۳- انجام SDS-PAGE بر روی پروتئین‌های استخراج شده گیاهان تراریخت ۱۰۷
شکل ۳-۲۴- آزمون ELISA برای گیاهان تراریخت کاهو.....۱۰۸
شکل ۳-۲۵- میزان تجمع پروانسولین انسانی نوترکیب در گیاهان تراریخت کاهو.....۱۰۸
شکل ۳-۲۶- آزمایش ایمونوبلاتینگ برای تایید بیان پروانسولین انسانی در گیاهان تراریخت. ۱۰۹

مقدمه

مقدمه

از شروع قرن نوزدهم تا سال ۱۹۷۰ انقلاب بزرگی در زمینه داروسازی اتفاق افتاد. در این سال‌ها با استفاده از علم شیمی داروهای فعال شیمیایی تولید، استخراج و خالص‌سازی شدند. در قرن بیستم، تولید شیمیایی داروها برای دانشمندان داروسازی در زمینه تولید تجاری داروها پیروزی بزرگی بود. این جهش در تولید دارو احتمالاً با تولید آسپرین (یک آنالوگ سنتتیک اسید سالیسیلیک) شروع شد که قبلاً از پوست درخت بید استخراج می‌شد. به صورت موازی با روش‌های شیمیایی، فرایندهای استخراج و خالص‌سازی داروها از موجودات زنده نیز انجام می‌شد. برای مثال استخراج انسولین از پانکراس خوک برای اولین بار در سال ۱۹۲۲ انجام شد. سپس زیست‌شناسی مدرن با توسعه مهندسی ژنتیک به عنوان یک مکمل برای روش‌های شیمیایی تولید و استخراج داروها، وارد دنیای صنعت داروسازی شد. این علم امکان تولید مولکول‌های پیچیده و غیر قابل سنتز از طریق روش‌های شیمیایی را امکان‌پذیر کرد. بعد از سال ۱۹۷۰ مهندسی ژنتیک (با تولید مولکول‌های دارویی در باکتری‌ها، مخمر و سلول‌های تراریخت پستانداران) به یک روش مکمل برای تولید و استخراج شیمیایی داروها تبدیل شد. اخیراً زراعت مولکولی گیاهان را به عنوان یکی از ابزارهای اصلی بازار تولید پروتئین‌های نوترکیب در جهان معرفی کرده است. در واقع گیاهان چندین مزیت مهم نسبت به سیستم‌های بیانی دیگر برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارند. از جمله این مزایا، هزینه تولید پایین، امکان تولید در مقیاس انبوه، امکان تولید محصولات پروتئینی عاری از ویروس و عوامل بیماریزا و در نهایت بر خلاف فرمانتورهای میکروبی، گیاهان قادر به انجام تغییرات پس از ترجمه می‌باشند که این تغییرات پس از ترجمه برای فعال نمودن محصولات تولیدی ضروری می‌باشند.

صنعت داروسازی در حال حاضر نیازمند سیستم‌های بیانی کارا و ارزان برای تولید پروتئین‌های دارویی می‌باشد. از دیدگاه صنعت داروسازی، سیستم ایده‌ال سیستمی است که توانایی انجام فرایندهای مهم از جمله تولید پروتئین نوترکیب با کیفیت بالا، هزینه کم و انجام تغییرات حین و پس از ترجمه بر روی پروتئین نوترکیب که برای فعال بودن پروتئین تولیدی از لحاظ زیستی مهم می‌باشد را دارا باشد (Walsh and Jefferis, 2006).

دنیایی را می‌توان تصور کرد که هر پروتئینی، چه آنهایی که در طبیعت توسط موجودات زنده تولید می‌شوند و چه آنهایی که بوسیله خود انسان طراحی می‌شوند با قیمت ارزان و به میزان تقریباً نامحدود تولید شوند. این دنیا زمانی به واقعیت می‌پیوندد که نحوه استفاده از توانایی گیاهان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس زراعی را یاد گرفته و به اجرا در بیاوریم. در حال حاضر چنین سیستم بیانی که توانایی انجام فرایندهای ذکر شده را داشته باشد ایجاد نشده است. به عنوان مثال پروتئین‌های دارویی پیچیده که در پروکاریوت‌ها تولید می‌شوند همیشه به درستی تا نمی‌خورند یا به درستی فراوری نمی‌شوند تا میزان مورد نظر فعالیت زیستی را داشته باشند. سیستم‌های بیانی میکروبی عموماً برای بیان و تولید پروتئین‌های دارویی ساده که نیاز به تاخوردگی خاص و یا نیاز به تغییرات پس از ترجمه برای فعال بودن در بدن موجود زنده را ندارند مناسب می‌باشند (Gomord and Faye, 2004). به دلیل محدودیت‌هایی که پروکاریوت‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب پیچیده‌تر دارند صنایع داروسازی برای بهینه‌سازی تولید، دو سیستم بیانی دیگر (مخمر و سلول‌های پستانداران) را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب برگزیده‌اند. با این وجود این سیستم‌های تولیدی معایبی از جمله انجام نامناسب تغییرات پس از ترجمه در مخمر و هزینه بالای تولید و امکان آلودگی با ویروس یا پریون در سلول‌های پستانداران دارند.

محدودیت‌های بیوشیمیایی، تکنیکی و اقتصادی که سیستم‌های بیان پروکاریوتی و یوکاریوتی دارند و نیز تقاضای روزافزون پزشکی برای پروتئین‌های دارویی پیچیده و عدم وجود ظرفیت کافی بیوراکتور باعث شده است که دانشمندان به فکر گسترش و ایجاد سیستم‌های بیان جدید مکمل برای تولید انبوه پروتئین‌های دارویی باشند. با توجه به موارد ذکر شده، گیاهان در دهه گذشته به عنوان یک مکمل مناسب برای سیستم‌های تولید کنونی پروتئین‌های نوترکیب تشخیص داده شده‌اند و امروزه توانایی آنها در تولید پروتئین‌های نوترکیب با هزینه کم، کیفیت بالا، ایمنی زیاد و فعال به اثبات رسیده است (Sourrouille *et al.*, 2009). با وجود اینکه در حال حاضر میزان بیان و تولید پروتئین‌های نوترکیب پایین می‌باشد ولی ظرفیت تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان تراریخت تقریباً نامحدود است و سطح بیان ژن هدف وابسته به سطح زیر کشت گیاه تراریخت می‌باشد. یک بیوراکتور گیاهی بسته به اینکه نوع گیاه مورد استفاده توتون، ذرت، سویا و یا یونجه باشد امکان تولید پروتئین‌های نوترکیب تا میزان ۲۰ کیلوگرم در هکتار را دارا می‌باشد (Khoudi *et al.*, 1999).

مزیت اصلی دیگری که گیاهان تراریخت نسبت به سیستم‌های بیان و تولید دیگر که هزینه تولید کم و امکان تولید در مقیاس وسیع را دارند (مانند مخمر و باکتری) این است که گیاهان توانایی انجام اکثر تغییرات مورد نیاز پس از ترجمه را که برای فعال بودن پروتئین نوترکیب ضرورت دارد را دارا هستند (Gomord *et al.*, 2005).

نظر به اینکه پروتئین‌ها به طور وسیعی در تحقیقات علمی، پزشکی و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند، استخراج و استفاده از پروتئین‌ها از منابع اصلی تولید کننده آنها می‌تواند مشکل و هزینه‌بر باشد. همچنین استفاده از پروتئین‌های دارویی که از موجودات تولیدکننده این پروتئین‌ها استخراج می‌شوند می‌تواند خطراتی را به همراه داشته باشد. برای مثال افراد زیادی در جامعه به دلیل استفاده از