بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشگاه تربیت مدرس**

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

# همسانه سازی ژن tPA همراه با توالی های ویژه و انتقال آن به سلول های توتون

**تحقیق و نگارش :**

حجت اله قاسمی

**استاد راهنما:**

دکتر مختار جلالی جواران

**استاد مشاور:**

دکتر هوشنگ علیزاده

زمستان ۹۰

نمونه

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

اعضای هیأت داوران نسخه ی نهائی پایان نامه خانم/آقای سید [illegible] ..... تحت عنوان :
همسانه سازی ژن EDA همراه با توالی های ویژه و انتقال آن به سلول های توتون
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 ی علمی | امضاء |
|---|---|---|---|
| ۱- استاد راهنما | مختار حیدری شوراب | دانشیار | |
| ۲- استاد مشاور | هوشنگ هراتی | استادیار | |
| ۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی | محمدصادق ثابت | استادیار | |
| ۴- اساتید ناظر: ۱- داخلی | محمدصادق ثابت | استادیار | |
| ۲- خارجی | [illegible] | | |

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 نگارنده در رشته بیوتکنولوژی است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران 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 حجت اله قاسمی دانشجوی رشته بیوتکنولوژی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

**نام و نام خانوادگی:**

**تاریخ و امضاء:**

۱۳۹۱/۲/۲۳

## آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

## دانشگاه تربیت مدرس

**مقدمه:** با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری 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 زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

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

ماده ۳- انتشار کتاب ، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه می باشد، باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

**این پایان نامه را به**

# پدر بزرگوار و عزیزم و

# مادر فداکار و مهربانم

## چکیده :

کشاورزی مولکولی یکی از دستاوردهای ارزشمند مهندسی ژنتیک در تولید پروتئین های نوترکیب بویژه واکسن ها، آنتی بادی ها ، هورمون ها و ... در گیاهان است. ویژگی های خاص گیاهان به عنوان بیوراکتور آنها را از سایر سیستم های تولیدی متمایز می نماید. پروتئین داروئی tPA tissue Plasminogen (Activator ) به طور اختصاصی و نسبتا قوی به لخته های خونی متصل شده و ترجیحا پلاسمینوژن به دام افتاده در داخل لخته ها را فعال و لخته خونی را از بین می برد. در این تحقیق با استفاده از پپتیدها ی راهنما و الحاقی سعی در افزایش کیفیت و نگهداری پروتیئن نوترکیب شده است. بدین منظور از پپتید های راهنمای Zera, SP-Zera, Extensin, KDEL و همچنین پپتیدهای الحاقی Trombin site, CPP, LTB His-tag, استفاده شد. این پپتیدهای راهنما و الحاقی بر حسب وظیفه به انتهای C – ترمینال یا N – ترمینال اضافه شد و همچنین یک توالی افزایش دهنده ی بیانی (*Kozak*) به ابتدای ژن اضافه شد. ناقل اصلی برای تمام سازهها pBI121 بود که به عنوان یک ناقل دوگانه در انتقال ژن به گیاهان استفاده می شود. سازه های تهیه شده (pSPt, pZt pKt, pEXt,) ابتدا به اگروباکتریوم سویه LBA4404 معرفی گردیدند و به صورت انتقال پایدار و دائمی به توتون منتقل شد. گیاهان تراریخت روی محیط انتخابگر (حاوی کانامایسین $mg.L^{-1}$ ۱۰۰ ) انتخاب شدند سپس جوانه های تراریخت ریشه دار شده ابتدا به پرلیت و سپس به خاک منتقل شدند. ارزیابی گیاهان تراریخت با استفاده از روش های مختلف مانند واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، سادرن بلاتRT-PCR، SDS-PAGE، الایزا و زیموگرافی انجام شد. این آزمون ها برای تعیین حضور، تعیین تعداد نسخه، انجام رونویسی، بررسی احتمالی حضور ژن، بیان و مقدار پروتیئن تولیدی و فعالیت پروتئین انجام شد.



## واژگان کلیدی:

پپتیدهای الحاقی، زراعت مولکولی، پروتئین نوترکیب، پلاسمینوژن بافتی، زایموگرافی، توتون

## فهرست مطالب

عنوان صفحه

**فصل اول-مقدمه**

۱-۱-مقدم ..... ۲

**فصل دوم-بررسی منابع**

بررسی منابع ..... ۴

۲-۱-تاریخچه ..... ۵

۲-۱-۱-کشاورزی مولکولی ..... ۵

۲-۱-۲-tPA ..... ۶

۲-۳-ژن tPA ..... ۷

۲-۴-بیماری های مرتبط ..... ۷

۲-۴-تجزیه لخته خونی ..... ۸

۲-۵-میل ترکیبی برای فیبرین ..... ۸

۲-۶-غلظت، فعالیت و نیمه عمر tPA ..... ۹

۲-۷-مهارکننده های tPA ..... ۹

۲-۸-داروی tPA ..... ۹

۸-۱- tPA تجارتی ..... ۱۰

۲-۹-خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین tPA ..... ۱۰

۲-۹-۱-نواحی عملکردی tPA ..... ۱۱

۲-۹-۲-گلیکوزیلاسیون ..... ۱۲

۲-۱۰-تولید tPA در باکتری ها ..... ۱۱

۲-۱۱-تولید پروتئین های نوترکیب در گیاهان ..... ۱۳
۲-۱۲-توتون ..... ۱۴
۲-۱۳-استفاده از یونجه زراعی به منظور تولید پروتئین های نوترکیب ..... ۱۵
۲-۱۴-سویا ..... ۱۵
۲-۱۵-روش های انتقال ..... ۱۶
۲-۱۵-۱-بیان پایدار در هسته یا ژنوم کلروپلاست ..... ۱۶
۲-۱۵-۲-بیان خارج کروموزومی ..... ۱۶

**فصل سوم-مواد و روش ها**

۳-۱-مواد شیمیایی و آنزیم ها ..... ۱۹
۳-۲-باکتری ها ..... ۱۹
۳-۳-آغازگرها ..... ۱۹
۳-۴-ناقل ها ..... ۱۹
۳-۵-گیاه توتون ..... ۲۰
۳-۵-۱-کاشت بذور توتون ..... ۲۰
۳-۶-گیاه یونجه ..... ۲۱
۳-۷-گیاه سویا ..... ۲۱
۳-۸-برش آنزیمی ..... ۲۱
۳-۹-همسانه سازی قطعه ی SPCPPHis-tag در ناقل pBI121 ..... ۲۱
۳-۱۰-انتقال ناقل حامل ژن tPA به باکتری *E. coli* ..... ۲۲
۳-۱۱-تعیین توالی ژن tPA کلون شده ..... ۲۳
۳-۱۲-برش آنزیمی ناقل های حاوی ژن tPA ..... ۲۳
۳-۱۳-جدا سازی وهمسانه سازی سیگنال Zera از گیاه ذرت ..... ۲۳
۳-۱۴-انتقال ناقل pBI121 حامل ژن tPA به آگروباکتریوم ..... ۲۳
۳-۱۵-اثبات و تایید ناقل حاوی ژن tPA در آگروباکتریوم ..... ۲۴

۳-۱۶-تخلیص ناقل بیانی گیاهی (pBI 121) ..... ۲۴
۳-۱۷-تراریخت نمودن توتون با استفاده از آگروباکتریوم ..... ۲۴
۳-۱۸-کشت بافت و مواد گیاهی ..... ۲۵
۳-۱۹-اگروواینفیلتریشن ..... ۲۵
۳-۲۰-۱-شرایط نگهداری برگ‌های اگروواینفیلتره شده ..... ۲۵
۳-۲۱-انتقال ژن توسط اگروباکتریوم ..... ۲۶
۳-۲۲-استخراج DNA ژنومی به روش CTAB ..... ۲۶
۳-۲۳-آزمون جهت تراریختی گیاهان ..... ۲۷
۳-۲۴-آزمون سادرن بلات ..... ۲۷
۳-۲۴-۱-تهیه شناساگر ..... ۲۸
۳-۲۴-۲-انجام آزمایش ..... ۲۸
۳-۲۵-بررسی گیاهان تراریخت در سطح RNA ..... ۲۸
۳-۲۶-استخراج پروتئین ..... ۲۸
۳-۲۷-آزمون SDS-PAGE ..... ۲۹
۳-۲۸-آزمون الایزا ..... ۲۹
۳-۲۹-آزمون زایموگرافی ..... ۲۹

**فصل چهارم نتایج و بحث**

نتایج و بحث ..... ۳۰
۴-۱- طراحی آغازگرها ..... ۳۱
۴-۲-ناقل ها ..... ۳۲
۴-۳-بررسی کیفیت DNA ژنومی ..... ۳۵
۴-۴-تکثیر ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) ..... ۳۵
۴-۵-تکثیر و جداسازی قطعه ی Zera از گیاه ذرت ..... ۳۶
۴-۶- همسانه سازی ژن tPA ..... ۳۷

۴-۷-همسانه سازی ژن tPA در ناقل pTZ57R ..... ۳۷
۴-۸-همسانه سازی قطعه Zera در ناقل pGEM-T Easy ..... ۴۰
۴-۹-انتقال موقت ژن هدف با استفاده از اگروایفیلتریشن ..... ۴۵
۴-۱۰- باززایی گیاهان تراریخت احتمالی ..... ۴۵
۴-۱۱-بررسی در سطح DNA ..... ۴۶
۴-۱۲- تعیین تعداد نسخه های منتقل شده به گیاهان تراریخته ..... ۴۷
۴-۱۳-بررسی در سطح RNA ..... ۴۹
۴-۱۴- آزمون در سطح پروتئین ..... ۵۲
۴-۱۴-۱-آزمون SDS-PAGE ..... ۵۲
۴-۱۴-۲-آزمون الایزا ..... ۵۵
۴-۱۴-۳-آزمون زیموگرافی گیاهان تراریخت ..... ۵۹
۴-۱۵-بحث ..... ۶۱
۴-۱۶-پیشنهادات ..... ۶۶

**منابع**

منابع ..... ۶۷
**پیوست** ..... ۷۱

**فهرست پیوست**

۱-۱-انتقال سازه‌های تائیدشده به اگروباکتریوم ..... ۷۲
۱-۲-ژن tPA با منشاء انسانی ..... ۷۳
۱-۳-محیط کشت باکتریایی LB ..... ۷۴
۱-۴-تهیه ذخیره (Stock) باکتری برای نگهداری طولانی مدت ..... ۷۴
۱-۵-محلول‌های ذخیره عناصرکم مصرف وپرمصرف ..... ۷۴
۱-۶-محلول ذخیره هورمون ها ..... ۷۶
۱-۶-۱-محلول ذخیره نفتالین استیک اسید ..... ۷۶

۱-۶-۲-محلول ذخیره هورمون بنزیل آمینو پورین..... ۷۶
۱-۷-استخراج DNA با روش CTAB..... ۷۷
۱-۸-انتقال ژن به قطعات برگی گیاه توتون توسط اگروباکتریوم..... ۷۸
۱-۹-محیط گزینشگر MS ..... ۷۹
۱-۱۰-آزمون سریع کلونی ها..... ۷۹
۱-۱۱-آزمون سادرن بلات..... ۸۰
۱-۱۲-**بررسی** در سطح RNA ..... ۸۲
۱-۱۳-واکنشRT-PCR ..... ۸۲
۱-۱۴-SDS-PAGE..... ۸۳
۱-۱۴-۱ طرز تهیه ژل..... ۸۵
۱-۱۵-آزمون الایزا..... ۸۷
۱-۱۶-مواد مورد نیاز برای آزمون زیموگرافی..... ۸۸

# فصل اول

# مقدمه

**مقدمه:**

امروزه از پروتئین‌ها در تحقیقات، پزشکی و صنعت به طور وسیع استفاده می‌شود، اما استخراج آن‌ها از منابع طبیعی مشکل و هزینه بر می‌باشد. از سوی دیگر استفاده از منابع طبیعی می تواند خطرات زیادی مانند انتقال بیماری‌ها از طریق هورمون‌ها و فرآورده‌های خونی به همراه داشته باشد (Ma *et al*., 2003). گیاهان تراریخت نزدیک به ربع قرن گذشته توسعه زیادی داشته و از گیاهانی که تنها ژن های گزارشگر یا ژن های نشانگر را در خود تظاهر می دادند، به گیاهانی که چندین صفت مطلوب را در خود تظاهر می دهند و گیاهانی که می توانند برای تولید واکسن و آنتی بادی و سایر داروهای نوترکیب مورد نیاز پزشکی انسانی مورد استفاده قرار گیرند تبدیل شده اند. رویکرد جدید پژوهشگران و شرکت های بزرگ و چند ملیتی داروسازی جهان به سمت داروهای تولید شده در گیاهان [1] یا PMP می باشد (قره یاضی،۱۳۸۵). پس از توسعه روش مهندسی ژنتیک در دهه ۱۹۷۰ تحول بزرگی در تولید پروتئین‌های ارزشمند به‌وجود آمد. انسولین و هورمون رشد انسانی اولین پروتئین‌های نوترکیبی بودند که از طریق روش مهندسی ژنتیک تولید شدند. به‌تدریج تولید پروتئین‌های نوترکیب جایگزین خالص-سازی آن‌ها از منابع طبیعی شد. بدون استفاده از روش مهندسی ژنتیک، برای تولید تنها ۸۰ میکروگرم هورمون انسانی خالص و فعال به ۳۰۰۰ کیلوگرم روده گاو نیاز است (Mahmoud *et a l,*. 2004).

تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب روز به روز افزایش پیدا کرد به نحوی که در سال ۲۰۰۶ ارزش تجاری ۷۷ نوع پروتئین نوترکیب مختلف به ۴۷/۴ میلیارد دلار رسید (لازم به ذکر است که در همان زمان نزدیک به ۱۰۴ پروتئین نوترکیب دیگر در مراحل کلینیکی و آزمایشی بودند). این رقم در سال ۲۰۱۰ با ۷ درصد رشد به ۵۳ میلیارد دلار رسید. به دنبال اولین انتقال موفق ژن به گیاهان در سال ۱۹۸۳ نسل اول گیاهان تراریخت با انتقال ژن های نشانگر قابل انتخاب نظیر ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک و ژن های گزارشگر نظیر gus پا به عرصه تحقیق و توسعه گذاشت. تنها هدف در این مرحله، بهینه سازی روش های انتقال ژن و در مراحل بعدی انجام مطالعات پایه در مورد بیان ژن و بررسی اثر عوامل محیطی بر میزان و مکان بیان ژن های تحت کنترل پیشبرهای [2] مختلف بود. از اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی به تدریج نسل دوم گیاهان تراریخت پا به عرصه وجود گذاشت. این گروه از

[1] - Plant Made Pharmaceuticals
2 - Promoters

گیاهان علاوه بر دارا بودن ژن های نشانگر قابل انتخاب نظیرnpt , hpt و گاهی ژن های گزارشگر نظیر gus , gfp دارای حداقل یک ژن با ارزش زراعی نظیر ژن های، Cry1ab کیتیناز و ... بودند.

گیاهان تراریختی که بیش از یک ژن با ارزش اقتصادی و زراعی را بیان می کنند به عنوان نسل سوم گیاهان تراریخت شناخته می شوند. از ابتدای هزاره سوم میلادی این قبیل گیاهان که به تظاهر همزمان ژن های مقاومت به آفات و تحمل به علفکش ها محدود می شود به زیر کشت رفت. غنی سازی گیاهان خوراکی از طریق افزایش تولید روی، آهن، پروتئین های شیر انسان و ویتامین ها در زمره گیاهان تراریخت نسل سوم و چهارم قرار دارند و با تولید و بازار رسانی آن ها توسط شرکت های مختلف در کشورهای زیادی با جدیت در دست تعقیب است. گیاهان تراریخت نسل چهارم، گیاهانی هستند که با اهداف استفاده های پزشکی و بهداشتی تولید می شوند.

**فرضیه ها:**

۱- امکان ساخت سازه tPA همراه توالی های ویژه مثل (His -tag وسیگنال های KDEL و Extensin) وجود دارد .

۲- امکان انتقال سازه ی تهیه شده به سلول های توتون وجود دارد.

۳- امکان تولید پروتئین فعال tPA منتقل شده به همراه His -tag در سلول های توتون تراریخت وجود دارد.

**هدف‌ها:**

۱- ساخت سازه ی ژنی tPA ی مناسب به منظور استخراج آسان تر و ارزان تر پروتئین نوترکیب tPA.

۲- امکان سنجی انتقال سازه ی تهیه شده حاوی ژن tPA همراه توالی های ویژه به سلول های توتون با استفاده از باکتری آگروباکتریوم ( LBA4404).

# فصل دوم

# بررسی منابع

## ۲-۱-تاریخچه

### ۲-۱-۱-کشاورزی مولکولی

سلول های گیاهی به طور افزاینده ای برای تولید ارزان تر پروتئین های نوترکیب و سایر محصولات زیستی در مقیاس وسیع و با خطر کمتر برای سلامتی انسان های مصرف کننده استفاده می شوند (Fischer *et al*., 1999).

یک شاخه ی جدید از بیوتکنولوزی گیاهی به عنوان کشاورزی مولکولی معرفی می شود که به طور عمده به بهره برداری از گیاهان مرتبط با کشاورزی به عنوان عامل هایی برای تولید انبوه مولکول های زیستی تمرکز می کند. به خصوص امکان تولید دارو های زیستی با استفاده از گیاهان، ایجاد راههای جدید و پیشنهاد راه حل هایی برای بعضی از مشکلات وابسته به سیستم های بیانی قدیمی است. به عنوان مثال پروتئین های چند زنجیره پیچیده، همانند انتی بادی ها در باکتری ها به خاطر نبود سیستم آنزیمی پیچیده شامل تغییرات پس از ترجمه پروتئین های تازه ساخته شده محدود می شوند. در میان سیستم های بیانی یوکاریوتی مخمر همیشه به عنوان هیپرگلیکوزاسیون محصول نهایی مناسب نیست (Malissard *et al,*. 1996). کشت های سلولی پستانداران و حشرات به سیستم های پیچیده و پیش ماده های گران و سنگین نیازمند است و ممکن است به سادگی با توکسین ها، ویروس ها، وریون ها آلوده شوند و سلامتی محصول نهایی را کاهش دهند. سیستم های گیاهی ممکن است برای تمام این مشکلات یک راه حل موثر داشته باشد. اول از همه سیستم های گیاهی قادر به تولید پروتئین ها به صورت ساختمانی و ساختاری مشابه آن هایی که در سلول های جانوری تولید می شوند هستند که تولیدات با کیفیت بالا عاری از پاتوژن های انسانی را ضمانت می کند. یک مزیت متفاوت گیاهان به عنوان راکتور زیستی توانایی ذخیره کردن ملکول های زیستی درون بذر و اندام ذخیره ای است که اجازه ی نگهداری آن را در دمای محیط می دهد. همچنین این امکان وجود دارد که به طور مستقیم محصول را از طریق خوراکی دریافت کرد. با این روش استخراج و خالص سازی محصول نوترکیب راحت تر است و مولکول ها درون دسته ای از کپسول ها (دیواره ی سلولی یا شبکه آندوپلاسمی یا درون اینکولوژن بادی ها) برای مدت طولانی تری حفظ می شوند. اولین پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاهان هورمون رشد انسانی است (Barta *et al,*. 1986).

بعد از آن بسیاری از پروتئین های نوترکیب دیگر در سیستم های گیاهی تولید شده اند و بعضی از آنها به تولید تجاری رسیده اند (Hood *et al,*. 1997).

این نکته حائز اهمیت است که گیاهان به عنوان رکتورهای زیستی ترکیبات داخلی (اسید سالیسیلیک و اپیات ها) با تغییر مسیر های بیوشیمیایی به منظور بهبود سطوح طبیعی بیان نیز به کار برده می شوند. هفتاد درصد از ترکیبات دارویی موجود از ترکیبات طبیعی یا مشتق شده از منشا گیاهی به وجود می آیند. خصوصیات اسیدآمینه هایی که ناحیه ی پپتید راهنمای یک پروتئین را تشکیل می دهند، عواملی هستند که به طور معنا داری برهمکنش را با سیستم انتقال پروتئین بازی می کنند، علاوه برآن تعیین کننده ی نوع پروتئین منتقل شونده نیز هستند. گروه های متفاوتی از پپتید های راهنما نقاط مختلفی از سلول را شناسایی می کنند. همه ی پروتئین ها دارای ناحیه ی پپتید راهنما نیستند، آنهایی که واجد پپتید راهنما نیستند در سیتوپلاسم باقی می مانند. ساختار متداول پپتید های نشانه برای پروتئین های متفاوت به طور عمومی به عنوان یک ناحیه ی دارای بار مثبت n که توسط یک ناحیه ی آب گریز و خنثی h و یک ناحیه ی قطبی c است دنبال می شود. در بسیاری از موارد اسید آمینه های در برگیرنده ی پپتید نشانه در مقصد نهایی قطع می شوند. این قطع شدگی بوسیله ی آنزیم هایی که که به عنوان سیگنال پپتیداز شناسایی می شوند انجام می شود.

### tPA –۲–۱–۲

در سال ۱۹۴۷ گزارش شد که بافتهای جانوری دارای عاملی هستند که می تواند پلاسمینوژن را فعال کند. این عامل به عنوان فیبرینوکایناز نامگذاری شد (Astrup *et al*., 1974). از این پس محققان زیادی تخلیص و تعیین ویژگی فعال کننده پلاسمینوژن را از بافت های مختلف شامل قلب و تخمدان خوک، عروق و خون پس از انجام ورزش را گزارش کردند. اولین شکل tPA انسانی با خلوص بالا از بافت رحم به دست آمد (تقریبا ۱ میلی گرم از ۵ کیلوگرم بافت رحم). در هفتمین کنگره بین المللی ترومبوزیز و هموستازی مدلی برای فیبرینولیز فیزیولوژیک عرضه شد (Collen, 1980). این مدل جامع، اساس عقیده فیبرین-اختصاصی بودن tPA را تشکیل داده و علاقه شدیدی برای استفاده از tPA به عنوان جایگزینی برای فعال کننده های پلاسمینوژن فیبرین -غیر اختصاصی که در آن زمان در دسترس بودند (مثل استرپتوکایناز و uPA ی دو

زنجیره ای) در درمان برانگیخت (Collen *et al.,* 2004). بر اساس این مدل پلاسمینوژن بوسیلهtPA به آنزیم پروتئولیتیک پلاسمین تبدیل می شود. اما این تبدیل به طور موثرتری فقط در سطح فیبرین رخ می دهد یعنی جایی که tPA و پلاسمینوژن در کنار هم قرار می گیرند. پلاسمین آزاد در خون به سرعت به وسیله α - آنتی پلاسمین غیر فعال می شود اما پلاسمین تولید شده در سطح فیبرین به طور نسبی از غیر فعال شدن ممانعت می شود.

## ۲-۳-ژن tPA

ژن tPA روی بازوی کوتاه کروموزوم ۸ انسان واقع شده است. توالی ژن شامل ۳۲۷۵۰ جفت باز می باشد که از این تعداد ۳۵۳۰ و ۳۴۴ جفت باز به ترتیب مربوط به نواحی احاطه کننده [1]مولکول در دو طرف َ 5 و َ 3 ژن می باشد. ۱۳ توالی اینترون، ژن را به ۱۴ ناحیه رمز کننده (اگزون) تقسیم کرده است. طول اگزون ها از ۴۳ تا ۹۱۴ جفت باز و طول اینترون ها از ۱۱۱ تا ۱۴۲ می باشد (Sandra *et al.,* 1986). مولکول mRNA بالغ حاصل از رونویسی ژن tPA دارای ۲۵۳۰ باز بجز توالی poly A می باشد که ۵۶۲ اسیدآمینه را رمز می کند. از ۳۵ اسیدآمینه موجود در قبل از شروع توالی پروتئین بالغ (۱- و۳۵- )، احتمالا ۳۰-۲۰ اسیدآمینه آن مربوط به پپتید نشانه آبدوست می باشد که در ادامه آن توالی ۱۵-۱۲ اسیدآمینه ای مربوط به پروتئین قرارگرفته است. به هر حال پس از ترجمه و ترشح tPA توالی ۳۵ تایی فوق حذف و پروتئین بالغ با ۵۲۷ ، اسیدآمینه به دست می آید (Pennica *et al.,* 1983).

## ۲-۴-بیماری های مرتبط

بر اساس اعلام رسمی سازمان بهداشت جهانی علل مرگ و میر ۱۷ میلیون نفر از حدود ۶ میلیارد نفر مردم جهان، بیماری های قلبی -عروقی می باشد ( قره یاضی، ۱۳۸۵) . بیماری های قلبی -عروقی مثل سکته، حمله میوکاردیال حاد و ترومبوامبولیسم وریدی احتمالا اصلی ترین عامل مرگ و میر در یک جمعیت بالغ می باشند. مهمترین عامل مطرح در این شرایط، اغلب انسداد لخته ای در رگ های خونی مهم می باشد که

[1]- Flanking

موجب نرسیدن خون به اندام های حیاتی می گردد. یک دیدگاه درمانی ترومبوز، تزریق داخل وریدی فعال کننده های پلاسمینوژن به عنوان داروی حل کننده لخته خون می باشد (Collen and Lijnen, 1991) .

## ۲-۴-۱-تجزیه لخته خونی

فعال کننده اصلی پلاسمینوژن در خون tPA می باشد در صورتی که نقش اصلی، uPA پروتئولیز وابسته به بافت است و عقیده بر این است که نقش آن در حذف فیبرین داخل عروقی نسبت به tPA، ثانویه می باشد. فیبرینولیز عمدتا در سطح فیبرین آغاز و منتشر می شود زیرا این سطح محل های اتصال برای تماس بهینه بین تعدادی از اجزای سیستم فیبرینولیتیک به خصوص پلاسمینوژن و tPA را مهیا می کند. این اثر تحریکی، غلظت بالائی از پلاسمینوژن و tPA را در رسوبات فیبرین به وجود می آورد و موجب متمرکز شدن فعالیت پلاسمین در این ناحیه می شود. تنظیم مهاری به وسیله مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن( -PAI-1 1=Plasminogen Activator Inhibitor) و مهار کننده پلاسمین انجام می گردد که PAI-1 مهمترین و موثرترین مهارکننده tPA در پلاسماست و اکثر tPA ی موجود در گردش خون به این مهارکننده متصل می گردد. به طور طبیعی یک تعادل کاملا تنظیم شده بین تشکیل فیبرین و حذف بعدی آن وجود دارد. به هر حال، در شرایط بیماری خاص و در نقص های ارثی، این تعادل بهم می خورد. بیماران دارای افزایش ارثی فعالیت فیبرینولیتیک معمولا خونریزی شدیدی دارند. برعکس، یک فعالیت کاهش یافته فیبرینولیتیک ممکن است با بیماری ترومبولیتیک همراه باشد (Ridker *et al*., 1994).

## ۲-۵-میل ترکیبی برای فیبرین

به دلیل میل ترکیبی ضعیف tPA برای پلاسمینوژن، در غیاب فیبرین، tPA فعال کننده پلاسمینوژن نسبتا ضعیفی می باشد. البته tPA میل ترکیبی زیادی برای فیبرین دارد و اتصالش به فیبرین، فعالیت آن را ۱۰۰۰ برابر افزایش می دهد. این میل شدید به محل های اتصال اختصاصی روی سطح فیبرین نسبت داده می شود که موجب متراکم شدن و جهت گیری صحیح tPA به پلاسمینوژن می شود و علاوه بر این، تجزیه لخته را به طور موثر پیش می برد (Nieuwenhuiten, 1994).